

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年3月4日 (04.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/018671 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07K 14/35, C12N 1/21,
C07K 19/00, C12Q 1/02, G01N 21/78, 21/64(KARASAWA, Satoshi) [JP/JP]; 〒396-0002 長野県 伊
那市 大字手良沢岡字大原 1 0 6 3-1 0 3 株式会社
医学生物学研究所 伊那研究所内 Nagano (JP). 水野 秀
昭 (MIZUNO, Hideaki) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和
光市 広沢 2 番 1 号 理化学研究所内 Saitama (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010628

(22) 国際出願日: 2003年8月22日 (22.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS &
CO.); 〒104-0031 東京都 中央区 京橋一丁目 8 番 7 号
京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-243337 2002年8月23日 (23.08.2002) JP
特願2002-243338 2002年8月23日 (23.08.2002) JP
特願2002-274266 2002年9月20日 (20.09.2002) JP
特願2002-280118 2002年9月26日 (26.09.2002) JP(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 理化学
研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市 広
沢 2 番 1 号 Saitama (JP). 株式会社医学生物学研究所
(MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO.,
LTD.) [JP/JP]; 〒460-0002 愛知県 名古屋市中区 丸の
内 3 丁目 5 番 1 0 号 住友商事丸の内ビル 5 F Aichi
(JP).(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮脇 敦史
(MIYAWAKI, Atsushi) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和
光市 広沢 2 番 1 号 理化学研究所内 Saitama (JP). 安
藤 亮子 (ANDO, Ryoko) [JP/JP]; 〒175-0094 東京都 板
橋区 成増 1 丁目 2 8 番 1 2 号 財団法人脳科学・
ライフテクノロジー研究所内 Tokyo (JP). 唐澤 智司添付公開書類:
— 国際調査報告書2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CHROMOPROTEIN AND FLUOROPROTEINS

(54) 発明の名称: 色素蛋白質及び蛍光蛋白質

(57) Abstract: It is intended to provide a novel chromoprotein and novel fluoroproteins. Namely, a chromoprotein originating in *Anthopleura inornata* and having definite properties; and fluoroproteins originating in *Trachyphyllia geoffroyi* and *Scolymia vitiensis* and having definite fluorescent properties.(57) 要約: 本発明の目的は、新規な色素蛋白質並びに蛍光蛋白質を提供することである。本発明によれば、ペリル
イソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来の所定の特性を有する色素蛋白質、並びにヒュサンゴ (*Trachyphyllia*
geoffroyi) 及びアザミハナガタサンゴ (*Scolymia vitiensis*) 由来の所定の蛍光特性を有する蛍光蛋白質が提供さ
れる。

WO 2004/018671 A1

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

明細書

色素蛋白質及び蛍光蛋白質

技術分野

本発明は、新規な色素蛋白質、より詳細にはベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来の新規な色素蛋白質及びその利用に関する。本発明はさらに、新規な蛍光蛋白質、より詳細には、ヒュサンゴ (*Trachyphyllia geoffroyi*) 及びアザミハナガタサンゴ (*Scolymia Vitiensis*) 由来の新規な蛍光蛋白質及びその利用に関する。

背景技術

クラゲのエクオレア・ビクトリア (*Aequorea victoria*) に由来する緑色蛍光蛋白質 (GFP) は、生物系において多くの用途を有する。最近、ランダム突然変異誘発法および半合理的 (semi-rational) 突然変異誘発法に基づいて、色を変化させたり、折りたたみ特性を改善したり、輝度を高めたり、あるいは pH 感受性を改変したといった様々な GFP 変異体が作製されている。遺伝子組み換え技術により他の蛋白質を GFP 等の蛍光蛋白質に融合させて、それらの発現および輸送のモニタリングを行うことが行われている。

最もよく使用される GFP 変異体の一つとして黄色蛍光蛋白質 (YFP) が挙げられる。YFP は、クラゲ (*Aequorea*) GFP 変異体の中でも最長波長の蛍光を示す。大部分の YFP の ϵ および Φ は、それぞれ 60,000~100,000 M⁻¹cm⁻¹ および 0.6~0.8 であり (Tsien, R. Y. (1998). *Ann. Rev. Biochem.* 67, 509-544)、これらの値は、一般的な蛍光団 (フルオレセインおよびローダミンなど) の値に匹敵する。従って YFP の絶対的輝度の改善は、ほぼ限界に達しつつある。

また、GFP 変異体の他の例として、シアン蛍光蛋白質 (CFP) があり、ECFP (enhanced cyan fluorescent protein) が知られている。また、イソギンチャク (*Discoma* sp.) からは赤色蛍光蛋白質 (RFP) も単離されており、DasRed

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

が知られている。このように蛍光蛋白質は、緑色、黄色、シアン色、赤色の4種が次々と開発されスペクトルの範囲は大幅に広がっている。

従来の蛍光蛋白質の量子収率を0に近づけたものが色素蛋白質である。色素蛋白質は、光エネルギーを他のエネルギーに変換する分子を細胞内に導入することができる点で様々な応用が可能である。しかしながら、色素蛋白質の吸収波長特性について報告されている例は少ない。

発明の開示

本発明は、ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) に由来する、ある特定の波長の光を吸収する新規な色素蛋白質を提供することを解決すべき課題とした。本発明はさらに、刺胞動物、特にイシサンゴの一種であるヒュサンゴ (*Trachyphyllia geoffroyi*) 及びアザミハナガタサンゴ (*Scolymia Vitiensis*) に由来する新規な一次構造を有する蛍光蛋白質を提供することを解決すべき課題とした。

上記課題を解決するために本発明者らは鋭意検討し、既知の蛍光蛋白質のアミノ酸配列の情報に基づいて好適なプライマーを設計し、緑色を呈するベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) のcDNAライブラリーから上記プライマーを用いて新規な色素蛋白質をコードする遺伝子を増幅してクローニングすることに成功した。さらに本発明者らは、得られたベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来の色素蛋白質の光吸収特性及びpH感受性を解析した。

さらに、本発明者らは、ヒュサンゴ (*Trachyphyllia geoffroyi*) 及びアザミハナガタサンゴ (*Scolymia Vitiensis*) 由来のcDNAライブラリーを用いてから発現クローニングを行った結果、新規な蛍光蛋白質をコードする遺伝子をクローニングすることに成功した。さらに本発明者らは、得られた蛍光蛋白質の蛍光特性を調べた結果、当該蛍光蛋白質が独特の蛍光特性を有することを見出した。

本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

即ち、本発明によれば、ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来の下記の特性を有する色素蛋白質が提供される。

- (1) 吸収極大波長が 605 nm である；
- (2) 605 nm におけるモル吸光係数が 47550 である；
- (3) 光吸収特性の pH 感受性が pH 5～10 で安定である；

本発明の別の側面によれば、以下の何れかのアミノ酸配列を有する色素蛋白質が提供される。

- (a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有するアミノ酸配列；

本発明の別の側面によれば、ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来の下記の特性を有する色素蛋白質が提供される。

- (1) 吸収極大波長が 553 nm である；
- (2) 553 nm におけるモル吸光係数が 25300 である；
- (3) 光吸収特性の pH 感受性が pH 5～10 で安定である；

本発明の別の側面によれば、以下の何れかのアミノ酸配列を有する色素蛋白質が提供される。

- (a) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有するアミノ酸配列；

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の蛋白質をコードする DNA が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、以下の何れかの DNA が提供される。

- (a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、
- (b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードするDNA：

本発明のさらに別の側面によれば、以下の何れかのDNAが提供される。

(a) 配列番号3に記載のアミノ酸配列をコードするDNA；又は、

(b) 配列番号3に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードするDNA：

本発明のさらに別の側面によれば、以下の何れかの塩基配列を有するDNAが提供される。

(a) 配列番号2に記載の塩基配列；又は、

(b) 配列番号2に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列：

本発明のさらに別の側面によれば、以下の何れかの塩基配列を有するDNAが提供される。

(a) 配列番号4に記載の塩基配列；又は、

(b) 配列番号4に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列：

本発明のさらに別の側面によれば、本発明のDNAを有する組み換えベクターが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明のDNA又は組み換えベクターを有する形質転換体が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の色素蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛋白質が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の色素蛋白質をアクセプター蛋白質として用いてFRET（蛍光共鳴エネルギー転移）法を行うことを特徴とする、生理

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

活性物質の分析方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の色素蛋白質、DNA、組み換えベクター、形質転換体、又は融合蛋白質を含む、吸光試薬キットが提供される。

さらに、本発明によれば、ヒュサンゴ (*Trachyphyllia geoffroyi*) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質が提供される。

(1) 紫外線の照射により緑色から赤色に変化し、励起極大波長が 508 nm (緑) 及び 572 nm (赤) であり、蛍光極大波長が 518 nm (緑) 及び 581 nm (赤) である；

(2) 508 nm におけるモル吸光係数 (緑) が $98800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、572 nm におけるモル吸光係数 (赤) が $60400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である；

(3) 量子収率が 0.80 (緑) 及び 0.33 (赤) である；及び

(4) 緑色及び赤色の pH 感受性についての pK_a は共に 5.7 である；

本発明の別の態様によれば、以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が提供される。

(a) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列；又は、

(b) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、かつ蛍光を有するアミノ酸配列；

本発明の別の態様によれば、配列番号 7 に記載のアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、アザミハナガタサンゴ (*Scolymia Vitiensis*) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質が提供される。

(1) 紫外線の照射により緑色から赤色に変化し、励起極大波長が 508 nm (緑) 及び 578 nm (赤) であり、蛍光極大波長が 518 nm (緑) 及び 588 nm (赤) である；

(2) 508 nm におけるモル吸光係数 (緑) が $102250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、578 nm におけるモル吸光係数 (赤) が $76950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であ

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

る；

(3) 量子収率（蛍光）が 0.43（緑）及び 0.51（赤）である；及び

(4) 緑色（508 nm）の pH 感受性について pKa が 5.8 であり、赤色（578 nm）の pH 感受性について pKa が 6.5 である。

本発明の別の態様によれば、以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が提供される。

(a) 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列；又は、

(b) 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、かつ蛍光を有するアミノ酸配列；

本発明の別の態様によれば、配列番号 11、13、15 又は 17 の何れかに記載のアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、以下の何れかの DNA が提供される。

(a) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、

(b) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列をコードし、かつ蛍光蛋白質をコードする DNA；

(c) 配列番号 6 に記載の塩基配列を有する DNA；又は、

(d) 配列番号 6 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ蛍光蛋白質をコードする DNA；

本発明のさらに別の態様によれば、以下の何れかの DNA が提供される。

(a) 配列番号 7 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、

(b) 配列番号 8 に記載の塩基配列を有する DNA。

本発明のさらに別の態様によれば、以下の何れかの DNA が提供される。

(a) 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、

(b) 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列をコードし、かつ蛍光蛋白質をコード

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

するDNA：

(c) 配列番号10に記載の塩基配列を有するDNA；又は、

(d) 配列番号10に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ蛍光蛋白質をコードするDNA：

本発明のさらに別の態様によれば、以下の何れかのDNAが提供される。

(a) 配列番号11、13、15又は17に記載のアミノ酸配列をコードするDNA；又は、

(b) 配列番号12、14、16又は18に記載の塩基配列を有するDNA。

本発明のさらに別の態様によれば、本発明のDNAを有する組み換えベクターが提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、本発明のDNA又は組み換えベクターを有する形質転換体が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の蛍光蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛍光蛋白質が提供される。好ましくは、他の蛋白質は、細胞内に局在する蛋白質である。さらに、好ましくは、他の蛋白質は、細胞内小器官に特異的な蛋白質である。

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の融合蛍光蛋白質を細胞内で発現させることを特徴とする、細胞内における蛋白質の局在または動態を分析する方法が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の蛍光蛋白質、DNA、組み換えベクター、形質転換体、又は融合蛍光蛋白質を含む、蛍光試薬キットが提供される。

図面の簡単な説明

図1は、本発明のベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来の色素蛋白質 (Be-G) の吸収スペクトルを測定した結果を示す。横軸は吸収光の波長を示し、縦軸は吸光度を示す。

図2は、本発明のベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来の色素

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

蛋白質 (Be-G) の吸光スペクトルの pH 感受性を示す。横軸は pH 値を示し、縦軸は吸光度を示す。605 nm は本発明のベリルイソギンチャク由来の色素蛋白質 (Be-G) 特有の吸光度を示し、277 nm は一般的に蛋白質定量として使われる吸光度 (芳香族アミノ酸の吸光) を示す。つまり、277 nm の値で蛋白質量が一定である事を示し、605 nm の値で本発明のベリルイソギンチャク由来の色素蛋白質 (Be-G) 特有の吸光度が pH 5 ~ pH 10 においてほとんど変化しないことを示す。

図 3 は、本発明のベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来の色素蛋白質 (Be-R) の吸収スペクトルを測定した結果を示す。横軸は吸収光の波長を示し、縦軸は吸光度を示す。

図 4 は、本発明のベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来の色素蛋白質 (Be-R) の吸光スペクトルの pH 感受性を示す。横軸は pH 値を示し、縦軸は吸光度を示す。553 nm は本発明のベリルイソギンチャク由来の色素蛋白質 (Be-R) 特有の吸光度を示し、277 nm は一般的に蛋白質定量として使われる吸光度 (芳香族アミノ酸の吸光) を示す。つまり、277 nm の値で蛋白質量が一定である事を示し、553 nm の値で本発明のベリルイソギンチャク由来の色素蛋白質 (Be-R) 特有の吸光度が pH 5 ~ pH 10 においてほとんど変化しないことを示す。

図 5 は、本発明の蛍光蛋白質 (Kaede) の吸収スペクトルを示す。

図 6 は、本発明の蛍光蛋白質 (Kaede) の蛍光スペクトルを示す。

図 7 は、本発明の蛍光蛋白質 (Kaede) の遺伝子を導入した HeLa 細胞を 470nm で励起して、510nm の蛍光で測定した結果を示す。

図 8 は、Kaede および Kaede2 の 12.5% アクリルアミドでの電気泳動パターンを示す。Kaede に比べ低い分子量として Kaede2 のバンドが現れる。

図 9 は、HeLa 細胞の形質膜に Kaede (上図) 及び Kaede2 (下図) をターゲティングされた時の発現パターンを示す。

図 10 は、紫 (外) 光照射依存的 Kaede タンパク質の切断を示す実験結果であ

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

る。上段の図は、紫（外）光照射依存的ペプチド鎖切断の推移を、12.5%アクリルアミドゲルによる電気泳動像で示す。Kaede 蛋白溶液に 365 nm 光照射を行い、20 分ごとにサンプリングして SDS/PAGE を行った。中段の図は、365 nm 光照射前（0 分）の吸収スペクトルを示す。下段の図は、365 nm 光照射 140 分後の吸収スペクトルを示す。

図 1 1 は、本発明の蛍光蛋白質 (Momiji) の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを示す。

図 1 2 は、本発明の蛍光蛋白質 (Momiji) の pH 感受性を示す。

図 1 3 は、本発明の蛍光蛋白質 (Momiji) に UV 365 nm を照射した場合の蛍光スペクトルの変化を示す。

図 1 4 は、本発明の蛍光蛋白質 (Momiji) に UV 365 nm を照射した場合の吸収スペクトルの変化を示す。

図 1 5 は、UV 照射前後の吸収スペクトルの変化 (Momiji2) を示す。

図 1 6 は、UV 照射前後の吸収スペクトルの変化 (Momiji4) を示す。

図 1 7 は、UV 照射前後の吸収スペクトルピークの pH による変化 (Momiji) を示す。照射前 (508 nm) 照射後 (578 nm)

図 1 8 は、UV 照射前後の吸収スペクトルピークの pH による変化 (Momiji2) を示す。照射前 (508 nm) 照射後 (576 nm)

図 1 9 は、UV 照射前後の吸収スペクトルピークの pH による変化 (Momiji4) を示す。照射前 (508 nm) 照射後 (583 nm)

図 2 0 は、365 nm 光照射時間による蛍光特性変化の推移 (Momiji) を示す。6 μ g/ml の蛋白溶液で測定した。変異体との差を明確にするために非常に弱い 365 nm の光で光変換を行い 470 nm から 650 nm までの蛍光スペクトルを測定した。

図 2 1 は、365 nm 光照射時間による蛍光特性変化の推移 (Momiji2) を示す。6 μ g/ml の蛋白溶液で測定した。変異体との差を明確にするために非常に弱い 365 nm の光で光変換を行い 470 nm から 650 nm までの蛍光スペクトルを測定した。

図 2 2 は、365 nm 光照射時間による蛍光特性変化の推移 (Momiji4) を示す。6 μ

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

g/ml の蛋白溶液で測定した。変異体との差を明確にするために非常に弱い 365 nm の光で光変換を行い 470 nm から 650 nm までの蛍光スペクトルを測定した。

図 2 3 は、HeLa 細胞内での蛍光特性の推移を示す。

Exposure time 410 nm 100ms

Green 400ms , Red 50ms

DM 420DCLP

Green Ex 475AF20, Em 530DF35

Red Ex 550DF35, Em 575ALP

Object lens X40 Uapo/340

410 nm 照射、緑蛍光測定、赤蛍光測定を 3 秒間隔で行った。

上記条件で測定を行い赤/緑の蛍光値をグラフ化した。

図 2 4 は、12.5%アクリルアミドゲル (Pseudo -native SDS/PAGE) での泳動パターンを青色光で励起してデジタルカメラで撮影した結果を示す。

WT (Momiji) : 四量体

d16 : 二量体

m16 : 単量体

図 2 5 は、365 nm 光照射前後の蛍光スペクトル(d16)を示す。

緑蛍光ピーク (518 nm)

赤蛍光ピーク (591 nm)

図 2 6 は、365 nm 光照射前後の蛍光スペクトル(m16)を示す。

緑蛍光ピーク (518 nm)

赤蛍光ピーク (587 nm)

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

(1) 本発明の色素蛋白質

本発明の第一の色素蛋白質は、ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*)

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

由来のものであり、下記の特性を有することを特徴とする。

- (1) 吸収極大波長が605nmである；
- (2) 605nmにおけるモル吸光係数が47550である；
- (3) 光吸収特性のpH感受性がpH5～10で安定である：

本発明の第二の色素蛋白質は、ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*)

由来のものであり、下記の特性を有することを特徴とする。

- (1) 吸収極大波長が553nmである；
- (2) 553nmにおけるモル吸光係数が25300である；
- (3) 光吸収特性のpH感受性がpH5～10で安定である：

ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) は、96本の触手を有し、規則正しく配列している。また、口盤は触手と同色で口のまわりが赤茶色に彩色されるのが本種の特徴である。体壁には98列の吸着イボが並び、体壁の下端付近まで分布する。体壁の色には大きな変異があり、褐色系、ブルー系、ピンク系が知られている。ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) は、北海道南部から九州に分布し、潮間帯付近に多産する。

なお、本書中以下の実施例では、ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) を出発材料として上記特性を有する色素蛋白質を単離したが、ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 以外のイソギンチャクから本発明の色素蛋白質を取得することができる場合もあり、そのような色素蛋白質も本発明の範囲内である。

本発明の第一の色素蛋白質 (Be-G) は、以下の実施例で示す通り、吸収極大波長が605nmであり、また、605nmにおけるモル吸光係数は47550である。

本発明の第二の色素蛋白質 (Be-R) は、以下の実施例で示す通り、吸収極大波長が553nmであり、また、553nmにおけるモル吸光係数は25300である。

モル吸光係数は蛍光分子1モルあたりの光子の吸収量を表す。量子収率は吸収

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

した光子のどれだけを蛍光として発することができるかを表した数値である。本発明の色素蛋白質の量子収率は極めて低いため、蛍光は殆ど発しない。この性質から、本発明の色素蛋白質は、(1) FRETのアクセプター分子(エネルギー受容体)として用いたり、(2) 照射した光のエネルギーを光以外のエネルギーに変換させるシステムの開発に利用したり、あるいは(3) 蛋白質のアミノ酸配列に変異を導入して蛍光を発するように改変することなどに用いることができる。

また、本発明の色素蛋白質は、光吸収特性のpH感受性がpH5～10で安定であることを特徴とする。即ち、本発明の色素蛋白質では、pH5～10の範囲において吸収スペクトルのピーク値の変動が少ない。従って、本発明の色素蛋白質は、広範囲のpH環境において同様の条件で 사용할 ことができ、生体内での使用に際しての制約は少ない。

本発明の色素蛋白質の具体例としては、以下の何れかのアミノ酸配列を有する色素蛋白質が挙げられる。

- (a) 配列番号1又は3に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号1又は3に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有するアミノ酸配列：

本明細書で言う「1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列」における「1から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

本明細書で言う「吸光特性」とは、ある波長の光を吸収できる特性を意味し、例えば、本明細書に示した色素蛋白質と同様に吸収極大波長が605nm又は553nmであつてもよいし、あるいは吸収極大波長の値がシフトしたものであつてもよい。なお、光吸収特性のpH感受性は、pH5～10で安定であることが好ましい。

上記した通り、本発明の配列表の配列番号1又は3に記載したアミノ酸配列を

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

有する色素蛋白質は蛍光をほとんど発しないものである。本発明においては、配列番号1又は3に記載したアミノ酸配列に対して1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を導入することにより、より強い蛍光を発する蛋白質を作製してもよく、このような蛋白質も本発明の範囲内に含まれる。

本発明の色素蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号1又は3に記載したアミノ酸配列並びに配列番号2又は4に記載した塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、それらを用いて、ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来のcDNAライブラリーを鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の色素蛋白質をコードするDNAを取得することができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の色素蛋白質を産生することができる。発現系での発現については本明細書中後記する。

(2) 本発明の蛍光蛋白質

本発明の第一の蛍光蛋白質は、ヒュサンゴ (*Trachyphyllia geoffroyi*) 由来のものであり、下記の特性を有することを特徴とする。

(1) 紫外線の照射により緑色から赤色に変化し、励起極大波長が508nm(緑)及び572nm(赤)であり、蛍光極大波長が518nm(緑)及び581nm(赤)である；

(2) 508nmにおけるモル吸光係数(緑)が $98800\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ であり、572nmにおけるモル吸光係数(赤)が $60400\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ である；

(3) 量子収率が0.80(緑)及び0.33(赤)である；及び

(4) 緑色及び赤色のpH感受性についてのpKaは共に5.7である；

ヒュサンゴ (*Trachyphyllia geoffroyi*) は、刺胞動物イソギンチャクの1種で、

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

非常にカラフルな蛍光を示すことを特徴とする。主として、本州中部以南に分布し、内湾の泥底などに生息し、夜間触手を伸ばしてプランクトンなどを捕獲する。

色のバリエーションとしては、緑色、褐色又は赤色のものが存在する。

本発明の第一の蛍光蛋白質は、以下の実施例で示す通り、紫外線の照射により緑色から赤色に変化し、励起極大波長が508nm（緑）及び572nm（赤）であり、蛍光極大波長は518nm（緑）及び581nm（赤）である。また、508nmにおけるモル吸光係数（緑）は98800M⁻¹cm⁻¹であり、572nmにおけるモル吸光係数（赤）は60400M⁻¹cm⁻¹である。

本発明の第一の蛍光蛋白質は、紫外光によって色が変わることを特徴とし、光によって特定の細胞や器官のマーキング（optical marking）が可能である。

本発明の第一の蛍光蛋白質の具体例としては、以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が挙げられる。

- (a) 配列番号5に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号5に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、かつ蛍光を有するアミノ酸配列；

本発明の第一の蛍光蛋白質の別の具体例としては、配列番号7に記載のアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が挙げられる。

本発明の第二の蛍光蛋白質は、アザミハナガタサンゴ（*Scolymia Vitiensis*）由来のものであり、下記の特性を有することを特徴とする。

- (1) 紫外線の照射により緑色から赤色に変化し、励起極大波長が508nm（緑）及び578nm（赤）であり、蛍光極大波長が518nm（緑）及び588nm（赤）である；
- (2) 508nmにおけるモル吸光係数（緑）が102250M⁻¹cm⁻¹であり、578nmにおけるモル吸光係数（赤）が76950M⁻¹cm⁻¹である；
- (3) 量子収率（蛍光）が0.43（緑）及び0.51（赤）である；及び

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

(4) 緑色 (508 nm) の pH感受性について pK_a が 5.8 であり、赤色 (578 nm) の pH感受性について pK_a が 6.5 である。

アザミハナガタサンゴ (*Scolymia Vitiensis*) は固着性の単体サンゴで、小型の個体は鉢型で円形であるが、大きくなると楕円形になる。サンゴ個体の中心には大きなスポンジ状の軸柱があり、莖壁から長い障壁がほぼ一定の傾斜で中心に伸びる。隔壁には大きな鋸歯があり、外からもその様子がうかがえる。昼間はポリプを開かない。色彩は普通暗緑色であるが赤色なども稀に見られる。アザミハナガタサンゴ属は約4種が知られているが、日本周辺海域には1種が分布している。

本発明の第二の蛍光蛋白質は、以下の実施例で示す通り、紫外線の照射により緑色から赤色に変化し、励起極大波長が508 nm (緑) 及び578 nm (赤) であり、蛍光極大波長は518 nm (緑) 及び588 nm (赤) である。また、508 nmにおけるモル吸光係数 (緑) は $102250 M^{-1} cm^{-1}$ であり、578 nmにおけるモル吸光係数 (赤) は $76950 M^{-1} cm^{-1}$ である。

本発明の第二の蛍光蛋白質は、紫外光によって色が変わることを特徴とし、光によって特定の細胞、器官又は蛋白質のマーキング (optical marking) が可能である。

本発明の第二の蛍光蛋白質の具体例としては、以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が挙げられる。

- (a) 配列番号9に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号9に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、かつ蛍光を有するアミノ酸配列：

本発明の蛍光蛋白質の別の具体例としては、配列番号11、13、15又は17の何れかに記載のアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が挙げられる。

本明細書で言う「1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列」における「1から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

本明細書で言う「蛍光を有する」とは、蛍光を発することができる全ての場合を包含し、蛍光強度、励起波長、蛍光波長、pH感受性などの諸特性は、配列番号5に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と比較して、変動していてもよい、同様のままでもよい。

本発明の蛍光蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号5、7、9、11、13、15又は17に記載したアミノ酸配列並びに配列番号6、8、10、12、14、16又は18に記載した塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、それらを用いて上記したような各種の公知の蛍光蛋白質のcDNAクローンを鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAを取得することができる。本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAの一部の断片を上記したPCRにより得た場合には、作製したDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の蛍光蛋白質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の蛍光蛋白質を産生することができる。発現系での発現については本明細書中後記する。

(3) 本発明のDNA

本発明によれば、本発明の色素蛋白質及び蛍光蛋白質をコードする遺伝子が提供される。

本発明の第一の色素蛋白質をコードするDNAの具体例としては、以下の何れかのDNAが挙げられる。

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

- (a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA ; 又は、
- (b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードする DNA :

本発明の第一の色素蛋白質をコードする DNA の更なる具体例としては、以下の何れかの塩基配列を有する DNA が挙げられる。

- (a) 配列番号 2 に記載の塩基配列 ; 又は、
- (b) 配列番号 2 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列 :

本発明の第二の色素蛋白質をコードする DNA の具体例としては、以下の何れかの DNA が挙げられる。

- (a) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA ; 又は、
- (b) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードする DNA :

本発明の第二の色素蛋白質をコードする DNA の更なる具体例としては、以下の何れかの塩基配列を有する DNA が挙げられる。

- (a) 配列番号 4 に記載の塩基配列 ; 又は、
- (b) 配列番号 4 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列 :

本発明の第一の蛍光蛋白質をコードする DNA の具体例としては、以下の何れかの DNA が挙げられる。

- (a) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA ; 又は、
- (b) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列をコードし、かつ蛍光蛋白質をコード

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

するDNA：

(c) 配列番号6に記載の塩基配列を有するDNA；又は、

(d) 配列番号6に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ蛍光蛋白質をコードするDNA：

本発明の第一の蛍光タンパク質をコードするDNAの更なる具体例としては、以下の何れかのDNAが挙げられる。

(a) 配列番号7に記載のアミノ酸配列をコードするDNA；又は、

(b) 配列番号8に記載の塩基配列を有するDNA。

本発明の第二の蛍光蛋白質をコードするDNAの具体例としては、以下の何れかのDNAが挙げられる。

(a) 配列番号9に記載のアミノ酸配列をコードするDNA；又は、

(b) 配列番号9に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列をコードし、かつ蛍光蛋白質をコードするDNA：

(c) 配列番号10に記載の塩基配列を有するDNA；又は、

(d) 配列番号10に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ蛍光蛋白質をコードするDNA：

本発明の第二の蛍光蛋白質をコードするDNAの更なる具体例としては、以下の何れかのDNAが挙げられる。

(a) 配列番号11、13、15又は17に記載のアミノ酸配列をコードするDNA；又は、

(b) 配列番号12、14、16又は18に記載の塩基配列を有するDNA。

本発明のDNAは、例えばホスホアミダイト法などにより合成することができ、特異的プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって製造することもできる。本発明のDNAの作製方法については、本明細書中上述した通りである。

また、所定の核酸配列に所望の変異を導入する方法は当業者に公知である。例

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

例えば、部位特異的変異誘発法、縮重オリゴヌクレオチドを用いるPCR、核酸を含む細胞の変異誘発剤又は放射線への露出等の公知の技術を適宜使用することによって、変異を有するDNAを構築することができる。このような公知の技術は、例えば、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989、並びに Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)に記載されている。

(4) 本発明の組み換えベクター

本発明のDNAは適当なベクター中に挿入して使用することができる。本発明で用いるベクターの種類は特に限定されず、例えば、自立的に複製するベクター（例えばプラスミド等）でもよいし、あるいは、宿主細胞に導入された際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであってもよい。

好ましくは、本発明で用いるベクターは発現ベクターである。発現ベクターにおいて本発明のDNAは、転写に必要な要素（例えば、プロモーター等）が機能的に連結されている。プロモータは宿主細胞において転写活性を示すDNA配列であり、宿主の種類に応じて適宜することができる。

細菌細胞で作動可能なプロモータとしては、バチルス・ステアロテルモフィルス・マルトジェニック・アミラーゼ遺伝子 (*Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase gene)、バチルス・リケニホルミス α アミラーゼ遺伝子 (*Bacillus licheniformis* alpha-amylase gene)、バチルス・アミロリケファチエンス・BAN アミラーゼ遺伝子 (*Bacillus amyloliquefaciens* BAN amylase gene)、バチルス・サブチリス・アルカリプロテアーゼ遺伝子 (*Bacillus Subtilis* alkaline protease gene) もしくはバチルス・プミルス・キシロシダーゼ遺伝子 (*Bacillus pumilus* xylosidase gene) のプロモータ、またはファージ・ラムダのPR若しくはPLプロモータ、大腸菌の lac、trp 若しくは tac プロモータなどが

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

挙げられる。

哺乳動物細胞で作動可能なプロモータの例としては、SV40プロモータ、MT-1（メタロチオネイン遺伝子）プロモータ、またはアデノウイルス2主後期プロモータなどがある。昆虫細胞で作動可能なプロモータの例としては、ポリヘドリンプロモータ、P10プロモータ、オートグラフィア・カリホルニカ・ポリヘドロシス塩基性タンパクプロモータ、バキュウロウイルス即時型初期遺伝子1プロモータ、またはバキュウロウイルス39K遅延型初期遺伝子プロモータ等がある。酵母宿主細胞で作動可能なプロモータの例としては、酵母解糖系遺伝子由来のプロモータ、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータ、TP11プロモータ、ADH2-4cプロモータなどが挙げられる。

糸状菌細胞で作動可能なプロモータの例としては、ADH3プロモータまたはtpiAプロモータなどがある。

また、本発明のDNAは必要に応じて、例えばヒト成長ホルモントーミネータまたは真菌宿主についてはTP11ターミネータ若しくはADH3ターミネータのような適切なターミネータに機能的に結合されてもよい。本発明の組み換えベクターは更に、ポリアデニレーションシグナル（例えばSV40またはアデノウイルス5E1b領域由来のもの）、転写エンハンサ配列（例えばSV40エンハンサ）および翻訳エンハンサ配列（例えばアデノウイルスVA RNAをコードするもの）のような要素を有していてもよい。

本発明の組み換えベクターは更に、該ベクターが宿主細胞内で複製することを可能にするDNA配列を具備してもよく、その一例としてはSV40複製起点（宿主細胞が哺乳類細胞のとき）が挙げられる。

本発明の組み換えベクターはさらに選択マーカーを含有してもよい。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）またはシゾサッカロマイセス・ポンベTP1遺伝子等のようなその補体が宿主細胞に欠けている遺伝子、または例えばアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン若しくはヒグロマイシンのような薬剤耐性遺伝子

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

を上げることができる。

本発明のDNA、プロモータ、および所望によりターミネータおよび／または分泌シグナル配列をそれぞれ連結し、これらを適切なベクターに挿入する方法は当業者に周知である。

(5) 本発明の形質転換体

本発明のDNA又は組み換えベクターを適当な宿主に導入することによって形質転換体を作製することができる。

本発明のDNAまたは組み換えベクターを導入される宿主細胞は、本発明のDNA構築物を発現できれば任意の細胞でよく、細菌、酵母、真菌および高等真核細胞等が挙げられる。

細菌細胞の例としては、バチルスまたはストレプトマイセス等のグラム陽性菌又は大腸菌等のグラム陰性菌が挙げられる。これら細菌の形質転換は、プロトプラスト法、または公知の方法でコンピテント細胞を用いることにより行なえばよい。

哺乳類細胞の例としては、HEK 293細胞、HeLa細胞、COS細胞、BHK細胞、CHL細胞またはCHO細胞等が挙げられる。哺乳類細胞を形質転換し、該細胞に導入されたDNA配列を発現させる方法も公知であり、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。

酵母細胞の例としては、サッカロマイセスまたはシゾサッカロマイセスに属する細胞が挙げられ、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) またはサッカロマイセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*) 等が挙げられる。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

他の真菌細胞の例は、糸状菌、例えばアスペルギルス、ニューロスボラ、フザ

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

リウム、またはトリコデルマに属する細胞である。宿主細胞として糸状菌を用いる場合、DNA構築物を宿主染色体に組み込んで組換え宿主細胞を得ることにより形質転換を行うことができる。DNA構築物の宿主染色体への組み込みは、公知の方法に従い、例えば相同組換えまたは異種組換えにより行うことができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる（例えば、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual ; 及びカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Bio/Technology, 6, 47 (1988) 等に記載）。

バキュロウイルスとしては、例えば、ヨトウガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞である Sf 9、Sf 21 [バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー (W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク (New York)、(1992)]、Trichoplusia ni の卵巣細胞である Hi Five (インビトロジェン社製) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法又はリポフェクション法等を挙げることができる。

上記の形質転換体は、導入されたDNA構築物の発現を可能にする条件下で適切な栄養培地中で培養する。形質転換体の培養物から、本発明の蛋白質を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

(6) 本発明の色素蛋白質及びそれを含む融合蛋白質の利用

本発明の色素蛋白質は、他の蛋白質と融合させることにより、融合蛋白質を構築することができる。本発明の色素蛋白質に融合させる他の蛋白質の種類は特に限定されないが、他の分子と相互作用する蛋白質であることが好ましく、例えば、受容体蛋白質又はそのリガンド、あるいは抗原又は抗体などが挙げられる。

本発明の融合蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え融合蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを入手することが必要である。本発明の色素蛋白質をコードするDNAおよびそれに融合すべき他の蛋白質をコードするDNAは、本明細書中上記した方法またはそれに準じてそれぞれ入手することができる。次いで、これらのDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の融合蛋白質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の融合蛋白質を産生することができる。

分子間の相互作用を分析する手法の一つとして、FRET(蛍光共鳴エネルギー転移)が知られている。FRETでは、例えば、第一の蛍光蛋白質としてのシアン蛍光蛋白質(CFP)で標識した第一の分子と、第二の蛍光蛋白質としての

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

黄色蛍光蛋白質（YFP）で標識した第二の分子とを共存させることにより、黄色蛍光蛋白質（YFP）をアクセプター分子として作用させ、シアン蛍光蛋白質（CFP）をドナー分子として作用させ、両者の間でFRET（蛍光共鳴エネルギー転移）を生じさせることにより、第一の分子と第二の分子との間の相互作用を可視化することができる。即ち、FRETでは2種類の分子にそれぞれ異なる色素を導入し、エネルギーレベルの高い方の色素（ドナー分子）を選択的に励起し、その色素の蛍光を測定し、もう一方の色素（アクセプター分子）からの長波長蛍光も測定して、それらの蛍光変化量によって分子間の相互作用を可視化する。両方の色素が、2種類の分子の相互作用によって近接したときのみドナー分子の蛍光の減少とアクセプター分子の蛍光の増加が1波長励起2波長測光法により観測される。しかし、アクセプター分子に色素蛋白質を用いた場合は、両方の色素が、2種類の分子の相互作用によって近接したときのみドナー分子の蛍光の減少を生じ1波長励起1波長測光法により観測することができる。即ち、測定機器の簡易化が可能となる。

本発明の色素蛋白質は、特に、FRET（蛍光共鳴エネルギー転移）におけるアクセプター分子としての利用価値が高い。即ち、本発明の色素蛋白質と被験物質との融合体（第一の融合体）を作製する。次いで、該被験物質と相互作用する別の被験物質と別の蛍光蛋白質との融合体（第2の融合体）を作製する。そして、第一の融合体と第2の融合体とを相互作用させ、発する蛍光を分析することにより、上記2種類の被験物質間の相互作用を分析することができる。なお、本発明の色素蛋白質を用いたFRET（蛍光共鳴エネルギー転移）は、試験管内で行ってもよいし、細胞内で行ってもよい。

（7）本発明の蛍光蛋白質及びそれを含む融合蛍光蛋白質の利用

本発明は蛍光蛋白質を他の蛋白質と融合させることにより、融合蛍光蛋白質を構築することができる。

本発明の融合蛍光蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成によ

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

り合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号5、7、9、11、13、15又は17に記載したアミノ酸配列及び配列番号6、8、10、12、14、16又は18に記載した塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、本発明の蛍光蛋白質の遺伝子を含むDNA断片を鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAを構築するのに必要なDNA断片を作製することができる。また同様に、融合すべき蛋白質をコードするDNA断片も入手する。

次いで、これらのDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の融合蛍光蛋白質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の融合蛍光蛋白質を産生することができる。

本発明の蛍光蛋白質は、特に、標識としての利用価値が高い。即ち、本発明の蛍光蛋白質を被検アミノ酸配列との融合蛋白質として精製し、マイクロインジェクション法などの手法により細胞内に導入し、該融合蛋白質の分布を経時的に観察すれば、被検アミノ酸配列の細胞内におけるターゲッティング活性を検出することが可能である。

本発明の蛍光蛋白質を融合させる他の蛋白質（被検アミノ酸配列）の種類は特に限定されるものではないが、例えば、細胞内に局在する蛋白質、細胞内小器官に特異的な蛋白質、ターゲティングシグナル（例えば、核移行シグナル、ミトコンドリアプレ配列）等が好適である。なお、本発明の蛍光蛋白質は、マイクロインジェクション法などにより細胞内に導入する以外に、細胞内で発現させて用いることも可能である。この場合には、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAが発現可能に挿入されたベクターが宿主細胞に導入される。

また、本発明の蛍光蛋白質は、レポーター蛋白質としてプロモーター活性の測

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

定に用いることも可能である。即ち、被検プロモーターの下流に、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAが配置されたベクターを構築し、これを宿主細胞に導入し、該細胞から発せられる本発明の蛍光蛋白質の蛍光を検出することにより、被検プロモーターの活性を測定することが可能である。被検プロモーターとしては、宿主細胞内で機能するものであれば、特に制限はない。

上記被検アミノ酸配列のターゲティング活性の検出やプロモーター活性の測定において用いられるベクターとしては、特に制限はないが、例えば、動物細胞用ベクターでは、「pNEO」(P. Southern, and P. Berg (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:327)、「pCAGGS」(H. Niwa, K. Yamamura, and J. Miyazaki. Gene 108, 193-200 (1991))、「pRc/CMV」(インビトロゲン社製)、「pCDM8」(インビトロゲン社製)などが、酵母用ベクターでは、「pRS303」, 「pRS304」, 「pRS305」, 「pRS306」, 「pRS313」, 「pRS314」, 「pRS315」, 「pRS316」(R. S. Sikorski and P. Hieter (1989) Genetics 122: 19-27)、「pRS423」, 「pRS424」, 「pRS425」, 「pRS426」(T. W. Christianson, R. S. Sikorski, M. Dante, J. H. Shero, and P. Hieter (1992) Gene 110: 119-122)などが好適に用いられる。

また、使用可能な細胞の種類も特に限定されず、各種の動物細胞、例えば、L細胞、BalbC-3T3細胞、NIH3T3細胞、CHO(Chinese hamster ovary)細胞、HeLa細胞、NRK(normal rat kidney)細胞、「Saccharomyces cerevisiae」などの酵母細胞や大腸菌(E. coli)細胞などを使用することができる。ベクターの宿主細胞への導入は、例えば、リン酸カルシウム法やエレクトロポレーション法などの常法により行うことができる。

上記のようにして得た、本発明の蛍光蛋白質と他の蛋白質(蛋白質Xとする)とを融合させた融合蛍光蛋白質を細胞内で発現させ、発する蛍光をモニターすることにより、細胞内における蛋白質Xの局在や動態を分析することが可能になる。即ち、本発明の融合蛍光蛋白質をコードするDNAで形質転換またはトランスフェクトした細胞を蛍光顕微鏡で観察することにより細胞内における蛋白質Xの局在や動態を可視化して分析することができる。

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

例えば、蛋白質Xとして細胞内オルガネラに特異的な蛋白質を利用することにより、核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、分泌小胞、ペルオキシソームなどの分布や動きを観察できる。

また、例えば、神経細胞の軸索、樹状突起などは発生途中の個体の中で著しく複雑な走向の変化を示すので、こういった部位を蛍光ラベルすることにより動的解析が可能になる。

本発明の蛍光蛋白質の蛍光は、生細胞のまま検出することが可能である。この検出は、例えば、蛍光顕微鏡（カールツァイス社 アキシオフォト フィルターセット 09）や画像解析装置（ATTO デジタルイメージアナライザー）などを用いて行うことが可能である。

顕微鏡の種類は目的に応じて適宜選択できる。経時変化を追跡するなど頻回の観察を必要とする場合には、通常の落射型蛍光顕微鏡が好ましい。細胞内の詳細な局在を追及したい場合など、解像度を重視する場合は、共焦点レーザー顕微鏡の方が好ましい。顕微鏡システムとしては、細胞の生理状態を保ち、コンタミネーションを防止する観点から、倒立型顕微鏡が好ましい。正立顕微鏡を使用する場合、高倍率レンズを用いる際には水浸レンズを用いることができる。

フィルターセットは蛍光蛋白質の蛍光波長に応じて適切なものを選択できる。

本発明の第一の蛍光蛋白質の場合、励起極大波長が508nm、蛍光極大波長が518である緑色を検出する場合は、励起光490～510nm、蛍光510～530nm程度のフィルターを使用することが好ましい。また、励起極大波長が572nmであり、蛍光極大波長が581nmである赤色を検出する場合は、励起光560～575nm、蛍光575～590nm程度のフィルターを使用することが好ましい。

本発明の第二の蛍光蛋白質の場合、励起極大波長が508nm、蛍光極大波長が518である緑色を検出する場合は、励起光490～510nm、蛍光510～530nm程度のフィルターを使用することが好ましい。また、励起極大波長が578nmであり、蛍光極大波長が588nmである赤色を検出する場合は、

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

励起光 570～580 nm、蛍光 580～595 nm 程度のフィルターを使用することが好ましい。

また、蛍光顕微鏡を用いた生細胞での経時観察を行う場合には、短時間で撮影を行うべきなので、高感度冷却 CCD カメラを使用する。冷却 CCD カメラは、CCD を冷却することにより熱雑音を下げ、微弱な蛍光像を短時間露光で鮮明に撮影することができる。

(8) 本発明のキット

本発明によれば、本明細書に記載した色素蛋白質、融合蛋白質、DNA、組み換えベクター又は形質転換体から選択される少なくとも 1 種以上を含むことを特徴とする、吸光試薬キットが提供される。さらに本発明によれば、本明細書に記載した蛍光蛋白質、融合蛍光蛋白質、DNA、組み換えベクター又は形質転換体から選択される少なくとも 1 種以上を含むことを特徴とする、細胞内成分の局在の分析及び／又は生理活性物質の分析のためのキットが提供される。本発明のキットは、それ自体既知の通常用いられる材料及び手法で調製することができる。

色素蛋白質、蛍光蛋白質又は DNA などの試薬は、適当な溶媒に溶解することにより保存に適した形態に調製することができる。溶媒としては、水、エタノール、各種緩衝液などを用いることができる。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

実施例 A-1 : イソギンチャクからの新規色素蛋白遺伝子の単離

(1) total RNA の抽出

イソギンチャクより色素蛋白遺伝子の単離を行った。材料には緑色を呈する 1 個体のベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) を用いた。凍結したベリルイソギンチャクを乳鉢で碎き、湿重量 1 グラムに "TRIzol" (GIBCO BRL) を 7.5

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

m l 加えてホモジナイズし、1500xg で 10 分間遠心した。上清にクロロホルム 1.5 m l を加え、15 秒間攪拌した後、3 分間静置した。7500xg で 15 分間遠心した。上清にイソプロパノール 3.75m l を加え、15 秒間攪拌した後、10 分間静置した。17000xg で 10 分間遠心した。上清を捨て 70%エタノールを 6ml 加えて 17000xg で 10 分間遠心した。上清を捨て沈殿を DEPC 水 200 μ l で溶解した。DEPC 水で溶解した total RNA を 100 倍に希釈して O. D. 260 と O. D. 280 の値を測定して RNA 濃度を測った。2.2mg の total RNA を得た。

(2) First strand cDNA の合成

total RNA 4 μ g を使用し、First strand cDNA の合成キット "Ready To Go" (Amersham Pharmacia) により cDNA (33 μ l) を合成した。

(3) Degenerated PCR

合成した First strand cDNA (33 μ l) のうち 3 μ l を鋳型として PCR を行った。プライマーのデザインは既知の蛍光蛋白のアミノ酸配列を見比べて、似ている部分を抜き出し、塩基配列に変換し直し作製した。

使用プライマー

5'- GAAGGRTGYGTCAAYGGRCAY -3' (primer1) (配列番号 19)

5'- ACVGGDCCATYDGVAAGAAARTT -3' (primer2) (配列番号 20)

I はイノシン、R は A 又は G、Y は C 又は T、V は A、C 又は G、D は A、G 又は T、S は C 又は G、H は A、T 又は C を示す。

PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X10 taq バッファー	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
100 μ M primer1	1 μ l

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

100 μ M primer2	1 μ l
ミリ Q	35 μ l
taq polymerase (5U/ μ l)	1 μ l

PCR 反応条件

94°C 1 分 (PAD)

94°C 30 秒 (変性)

52°C 30 秒 (プライマーの鋳型へのアニーリング)

72°C 1 分 (プライマー伸長)

上記3ステップを30サイクル行い、アニーリング温度を1サイクルごとに0.3°C下げた。30サイクル時の温度は43°C。

72°C 7 分 (最後の伸長)

4°Cで保持

一回目のPCR反応で得られた増幅産物1 μ lをテンプレートとして、もう一度同じ条件でPCRを行った。アガロースゲル電気泳動で、350bpを切り出し、精製した。

(4) サブクローニング及び塩基配列の決定

精製したDNA断片をpT7-blue vector (Novagen)にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセレクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入されたDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーにより決定した。得られた塩基配列を他の蛍光蛋白遺伝子の塩基配列と比較してそのDNA塩基配列が蛍光蛋白由来のものであるかを判断した。蛍光蛋白遺伝子の一部であると判断したものに関して、5'-RACE法および3'-RACE法による遺伝子全長のクローニングを行った。

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

(5) 5'-RACE 法

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 5'側の塩基配列を決定するために 5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO BRL) を用いて、5'-RACE 法を行った。鋳型として (1) で調製した total RNA を 4 μ g 使用した。

dC-tailed cDNA の一回目の増幅には

5'-ggccacgcgtcgactagtagcggiiggggiiggg-3' (primer3) (配列番号 2 1)

5'- AAGAGACTCCTTGAAGTAATCGGGA -3' (primer4) (配列番号 2 2)

のプライマーを用いた。

I はイノシンを示す。

二回目の増幅には

5'-ggccacgcgtcgactagtagc-3' (primer5) (配列番号 2 3)

5'- AAAATATCGTACGCAAAGGG -3' (primer6) (配列番号 2 4)

のプライマーを用いた。PCR 反応条件等はキットのプロトコールに準じた。

アガロースゲル電気泳動で、増幅された 200bp のバンドを切り出し、精製した。精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。

(6) 3'-RACE 法

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 3'側部分は、(4) の塩基配列決定で得られた情報を基に作製したプライマーとオリゴ dT プライマーの PCR で得た。鋳型として (2) で調製した first strand cDNA を 3 μ l 使用した。

作成したプライマーは、

5'- AGGAGGTCCGCTACCCCTTG -3' (primer7) (配列番号 2 5)

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X10 taq バッファー	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
20 μ M primer7	1 μ l
10 μ M オリゴ dTprimer	1 μ l
ミリ Q	35 μ l
taq polymerase (5U/ μ l)	1 μ l

PCR 反応条件

94°C 1 分 (PAD)
94°C 30 秒 (変性)
52°C 30 秒 (プライマーの鋳型へのアニーリング)
72°C 1 分 (プライマ伸長)
上記 3 ステップを 30 サイクル行った。
72°C 7 分 (最後の伸長)
4°C で保持

アガロースゲル電気泳動で、増幅された約 1000bp のバンドを切り出し、精製した。精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセレクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。得られた全長の塩基配列を配列表の配列番号 2 に示し、全長のアミノ酸配列を配列表の配列番号 1 に示す。

実施例 A-2 : 大腸菌での蛋白発現

得られた全長の塩基配列より、蛋白の N 末端に相当する部分でプライマーを作

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

製し、C末端側はオリゴdTプライマーを使用して、実施例A-1の(2)で調製したFirst strand cDNAを鋳型としてPCRを行った。

使用プライマー

5'- CCCGGATCCGACCATGGCTACCTTGGTTAAAGA -3' (primer8) (配列番号26)

PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X10 pyrobest バッファー	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
100 μ M primer8	1 μ l
100 μ M オリゴdTプライマー	1 μ l
ミリQ	35 μ l
pyrobest polymerase (5U/ μ l)	1 μ l

PCR 反応条件

94°C 1分(PAD)

94°C 30秒(変性)

52°C 30秒(プライマーの鋳型へのアニーリング)

72°C 1分(プライマー伸長)

上記3ステップを30サイクル行った。

72°C 7分(最後の伸長)

4°Cで保持

アガロースゲルの電気泳動で、増幅された約1100bpのバンドを切り出し、精製してpRSET vector(Invitrogen)のBamHI、EcoRI部位にサブクローニングして、大腸菌株(JM109-DE3)で発現させた。発現蛋白はN末端にHis-tagが付くようにコンストラクトしたので発現蛋白はNi-Agarose gel(QIAGEN)で精製した。精製の

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

方法は付属のプロトコールに準じた。この色素蛋白質をBe-Gと命名する。以下の実施例3では、精製した蛋白の性質を解析した。

実施例A-3：色素蛋白質（Be-G）の性質

（1）光吸収特性の解析

20 μ M 色素蛋白（Be-G）、50mM HEPES pH7.9 溶液を用いて吸収スペクトルを測定した。このスペクトルのピークの値よりモル吸光係数を計算した。緑色個体由来色素蛋白（Be-G）では605nmに吸収のピークが認められた（表1、図1）。

表1

	吸収極大	蛍光極大	モル吸光係数	量子収率	pH感受性	アミノ酸数
Be-G	605nm	-	47550(605nm)	-	>pH5でなし	229a.a.

（2）pH感受性の測定

50mM の下記の緩衝液中で蛋白質の吸収スペクトルを測定した（図2）。

各 pH の緩衝液は次の通り、

pH4、5 : 酢酸バッファー

pH6 : リン酸バッファー

pH7、8 : HEPES バッファー

pH9、10 : グリシンバッファー

図2の結果から分かるように、pH5~10でピークの値は安定していた。

実施例B-1：イソギンチャクからの新規色素蛋白遺伝子の単離

（1）total RNA の抽出

イソギンチャクより色素蛋白遺伝子の単離を行った。材料には赤色を呈する1個体のベリルイソギンチャク（*Anthopleura inornata*）を用いた。凍結したベリルイソギンチャクを乳鉢で砕き、湿重量1グラムに"TRIzol"（GIBCO BRL）を7.5

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

m l 加えてホモジナイズし、1500xg で 10 分間遠心した。上清にクロロホルム 1.5 m l を加え、15 秒間攪拌した後、3 分間静置した。7500xg で 15 分間遠心した。上清にイソプロパノール 3.75m l を加え、15 秒間攪拌した後、10 分間静置した。17000xg で 10 分間遠心した。上清を捨て 70%エタノールを 6ml 加えて 17000xg で 10 分間遠心した。上清を捨て沈殿を DEPC 水 200 μ l で溶解した。DEPC 水で溶解した total RNA を 100 倍に希釈して O. D. 260 と O. D. 280 の値を測定して RNA 濃度を測った。3mg の total RNA を得た。

(2) First strand cDNA の合成

total RNA 4 μ g を使用し、First strand cDNA の合成キット "Ready To Go" (Amersham Pharmacia) により cDNA (33 μ l) を合成した。

(3) Degenerated PCR

合成した First strand cDNA (33 μ l) のうち 3 μ l を鋳型として PCR を行った。プライマーのデザインは既知の蛍光蛋白のアミノ酸配列を見比べて、似ている部分を抜き出し、塩基配列に変換し直し作製した。

使用プライマー

5'- GAAGGRTGYGTCAAYGGRCAY -3' (primer1) (配列番号 19)

5'- ACVGGDCCATYDGVAAAGAAARTT -3' (primer2) (配列番号 20)

I はイノシン、R は A 又は G、Y は C 又は T、V は A, C 又は G、D は A, G 又は T、S は C 又は G、H は A、T 又は C を示す。

PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X10 taq バッファー	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
100 μ M primer1	1 μ l
100 μ M primer2	1 μ l

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

ミリ Q	35 μ l
taq polymerase (5U/ μ l)	1 μ l

PCR 反応条件

94°C 1 分 (PAD)

94°C 30 秒 (変性)

52°C 30 秒 (プライマーの鋳型へのアニーリング)

72°C 1 分 (プライマー伸長)

上記3ステップを30サイクル行い、アニーリング温度を1サイクルごとに0.3°C下げた。30 サイクル時の温度は43°C。

72°C 7 分 (最後の伸長)

4°Cで保持

一回目の PCR 反応で得られた増幅産物 1 μ l をテンプレートとして、もう一度同じ条件で PCR を行った。アガロースゲル電気泳動で、350bp を切り出し、精製した。

(4) サブクローニング及び塩基配列の決定

精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。得られた塩基配列を他の蛍光蛋白遺伝子の塩基配列と比較してその DNA 塩基配列が蛍光蛋白由来のものであるかを判断した。蛍光蛋白遺伝子の一部であると判断したものに関して、5'-RACE 法および 3'-RACE 法による遺伝子全長のクローニングを行った。

(5) 5'-RACE 法

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 5'側の塩基配列を決定するために 5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO BRL) を用いて、5'-RACE 法を行った。鋳型として (1) で調製した total RNA を 4 μ g 使用した。

赤色の個体由来の DC-tailed cDNA の一回目の増幅には

5'-ggccacgcgtcgactagtagcggiiggggiiggggiig-3' (primer3) (配列番号 2 1)

5'- AAGAGACTCCTTGAAGTAATCGGGA -3' (primer4) (配列番号 2 2)

のプライマーを用いた。

I はイノシンを示す。

二回目の増幅には

5'-ggccacgcgtcgactagtag-3' (primer5) (配列番号 2 3)

5'- AAAATATCGTACGCAAAGGG -3' (primer6) (配列番号 2 4)

のプライマーを用いた。PCR 反応条件等はキットのプロトコールに準じた。

アガロースゲル電気泳動で、増幅された 200bp のバンドを切り出し、精製した。精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセレクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。

(6) 3'-RACE 法

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 3'側部分は、(4) の塩基配列決定で得られた情報を基に作製したプライマーとオリゴ dT プライマーの PCR で得た。鋳型として (2) で調製した first strand cDNA を 3 μ l 使用した。

作成したプライマーは

5'- AGGAGGTCCGCTACCCTTG -3' (primer7) (配列番号 2 5)

PCR 反応液組成

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X10 taq バッファー	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
20 μ M primer7	1 μ l
10 μ M オリゴ dT primer	1 μ l
ミリ Q	35 μ l
taq polymerase (5U/ μ l)	1 μ l

PCR 反応条件

94°C 1分(PAD)

94°C 30秒(変性)

52°C 30秒(プライマーの鋳型へのアニーリング)

72°C 1分(プライマ伸長)

上記3ステップを30サイクル行った。

72°C 7分(最後の伸長)

4°Cで保持

アガロースゲル電気泳動で、増幅された約1000bpのバンドを切り出し、精製した。精製したDNA断片をpT7-blue vector (Novagen)にライゲーションした。大腸菌株(TG1)にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセレクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNAを精製して、挿入されたDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーにより決定した。得られた全長の塩基配列を配列表の配列番号4に示し、全長のアミノ酸配列を配列表の配列番号3に示す。

実施例B-2：大腸菌での蛋白発現

得られた全長の塩基配列より、蛋白のN末端に相当する部分でプライマーを作製し、C末端側はオリゴdTプライマーを使用して、実施例B-1の(2)で調製し

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

た First strand cDNA を鋳型として PCR を行った。

使用プライマー

5'- CCCGGATCCGACCATGGCTACCTTGTTAAAGA -3' (primer8) (配列番号 26)

PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X10 pyrobest バッファー	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
100 μ M primer8	1 μ l
100 μ M オリゴ dT プライマー	1 μ l
ミリ Q	35 μ l
pyrobest polymerase (5U/ μ l)	1 μ l

PCR 反応条件

94°C 1 分 (PAD)

94°C 30 秒 (変性)

52°C 30 秒 (プライマーの鋳型へのアニーリング)

72°C 1 分 (プライマー伸長)

上記 3 ステップを 30 サイクル行った。

72°C 7 分 (最後の伸長)

4°C で保持

アガロースゲルの電気泳動で、増幅された約 1100bp のバンドを切り出し、精製して pRSET vector (Invitrogen) の BamH I、EcoR I 部位にサブクローニングして、大腸菌株 (JM109-DE3) で発現させた。発現蛋白は N 末端に His-tag が付くようにコンストラクトしたので発現蛋白は Ni-Agarose gel (QIAGEN) で精製した。精製の方法は付属のプロトコールに準じた。この色素蛋白質を B e - R と命名する。以

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

下の実施例 3 では、精製した蛋白の性質を解析した。

実施例 B-3 : 色素蛋白質 (Be-R) の性質

(1) 光吸収特性の解析

20 μ M 色素蛋白、50mM HEPES pH7.9 溶液を用いて吸収スペクトルを測定した。このスペクトルのピークの値よりモル吸光係数を計算した。赤色の個体由来色素蛋白 (Be-R) では 553nm に吸収のピークが認められた (表 2、図 3)。

表 2

	吸収極大	蛍光極大	モル吸光係数	量子収率	pH感受性	アミノ酸数
Be-R	553nm	-	25300(553nm)	-	>pH5でなし	229a.a.

(2) pH感受性の測定

50mM の下記の緩衝液中で蛋白質の吸収スペクトルを測定した (図 4)。

各 pH の緩衝液は次の通り、

pH4、5 : 酢酸バッファー

pH6 : リン酸バッファー

pH7、8 : HEPES バッファー

pH9、10 : グリシンバッファー

図 4 の結果から分かるように、pH5~10 でピークの値は安定していた。

実施例 C-1 : サンゴからの新規蛍光蛋白遺伝子 (Kaede) の単離

色彩に富む蛍光を放つヒュサンゴ *Trachyphyllia geoffroyi* から、蛍光蛋白遺伝子を以下の手順で単離した。

(1) total RNA の抽出

Acid Guanidium-Phenol-Chroloform 法で total RNA を抽出した。

凍結したヒュサンゴを Multi-Beads Shocker (安井器械) を用いて変性溶液中で

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

碎き、フェノール／クロロホルムを加え、遠心して蛋白質、DNA と RNA を分離する。RNA を含む水層を isopropanol に加え遠心すると、沈殿として total RNA が得られる。

(2) RNA の精製

Oligotex-dT30 (Roche 社製)を用いて、total RNA から mRNA を分離した。

total RNA に Oligotex-dT30<super> を加え、加熱して RNA の 2 次構造を壊してから、37℃で RNA と Oligotex-dT を結合させる。洗浄後、加熱、遠心すると、mRNA が溶出された上清が得られる。Oligotex-dT を取り除いた上、ethanol と NaCl で mRNA 沈殿させ、水に溶した。

(3) cDNA の作製

TimeSaver と Directional Cloning Toolbox (共に Amersham pharmacia 社製)を用いて cDNA 断片を作製した。

mRNA を加熱して 2 次構造を壊した後、First-Strand Reaction Mix に DTT と NotI-dT primer と共に加え、first-strand を合成する。更にそれを Second-Strand Reaction Mix に加え、second-strand を合成し、付属のスパンカラムで精製する。精製した double-stranded cDNA の両端に EcoRI adaptor を付け、NotI で 3'側のみカットする。もう一度スパンカラムで精製して、cDNA 断片 (EcoRI- NotI) を得た。

(4) Expression Cloning

pRSETB (Invitrogen 社製)に EcoRI、NotI サイトを設け、作製した cDNA を挿入、大腸菌の JM109 DE3 株に導入して、LA プレートで培養した。この株では蛋白が合成されるため、UV を照射した時に蛍光を発するコロニーを単離した。

その結果、約 13 万個から 2 個の蛍光を持つコロニーを得た。塩基配列を DNA シークエンサーにより決定し、このクローンを Kaede と命名した。Kaede のアミ

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

ノ酸配列を配列表の配列番号 5 に記載し、塩基配列を配列表の配列番号 6 に記載する。

(5) 蛍光特性の解析

(a) 蛋白の発現と精製

得られた全長 cDNA の N 末端に BamHI サイトを、C 末端に EcoRI サイトを設け、pRSETB (Invitrogen 社製) に in frame でサブクローニングして、大腸菌の JM109 DE3 株で発現させた。発現蛋白は N 末端の His-tag を利用して、Ni-Agarose gel (QIAGEN 社製) を用いて精製した。

(b) 吸収スペクトルとモル吸光係数、蛍光スペクトルと量子収率

この蛍光蛋白質は、UV を照射することで吸収及び蛍光スペクトルが緑から赤に長波長シフトする。図 5 は、精製蛋白の UV 照射前後の吸収スペクトルを示す (実線が前、点線が後)。モル吸光係数は、蛋白濃度と吸収極大での吸光度より求めた (表 3)。

蛍光スペクトルは、UV 照射前後を 480nm で励起して測定し (図 6)、量子収率を Fluorescein (Molecular Probes 社製) と比較して算出した (表 3)。

Kaede の蛍光特性を以下の表 3 に示す。

表 3

Kaede の蛍光特性

励起極大 (nm)	蛍光極大 (nm)	モル吸光係数 ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)	量子収 率	PH 感受性 (pKa)	アミノ酸 数
緑 : 508nm 赤 : 572nm	緑 : 518nm 赤 : 581nm	緑 : 98,800 (508nm) 赤 : 60,400 (572nm)	緑 : 0.80 赤 : 0.33	緑 : 5.7 赤 : 5.7	225

(c) pH 感受性の特性

緑、赤それぞれにつき pH 4 ~ 11 のバッファー中での吸収スペクトルを測定

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

した。緑、赤共に pH 9 を境に吸収は徐々に落ちてくる。吸収極大の変化から算出した pKa を上記の表 3 中に示した。

実施例 C-2 : 哺乳類細胞への新規蛍光蛋白の遺伝子導入

HeLa 細胞に LIPOFECTIN Reagent (Gibco 社) を用いて Kaede の遺伝子を導入した。図 7 は、470nm で励起して 510nm の蛍光で測定したもので、導入後 9 時間前後で蛍光が確認できる。哺乳類細胞中でも、UV を照射すると蛍光が長波長にシフトする。

実施例 C-3 : Kaede の二量体化

Kaede は四量体を形成するため、他の蛋白質を融合させた際に発現パターンに異常が見られる場合がある。そこで、Kaede の 158 番目のトレオニン (T) をアルギニン (R) に、160 番目のアラニン (A) をグルタミン酸 (E) に置換し、二量体変異体を作製した。この変異体を Kaede 2 とした。Kaede 2 のアミノ酸配列及び塩基配列を配列表の配列番号 7 及び 8 にそれぞれ示す。12.5% アクリルアミドゲルのサンプルを煮沸しない電気泳動 (Pseudonative SDS/PAGE) において、Kaede 2 は Kaede よりも低分子としてバンドが検出された (図 8)。また、HeLa 細胞の細胞形質膜に Kaede、Kaede 2 を発現させたとき、Kaede は明らかに正常でない発現パターンを示した。しかし、Kaede 2 に於いては正常に細胞形質膜にターゲティングされた発現パターンを示した (図 9)。

実施例 C-4 : 紫 (外) 光照射依存的 Kaede タンパク質の切断

紫 (外) 光照射による Kaede の緑から赤への蛍光特性変換はタンパク質の切断を伴う。12.5% アクリルアミドゲルの電気泳動の結果は、365 nm 光照射により 27kDa の Kaede 分子が 17kDa と 10kDa のペプチド鎖に切断される事を示し (図 10 上段)、且つ、365 nm 光照射により 508 nm の吸収値が減少し、572 nm の吸収値が増加するという緑から赤への蛍光特性変換と一致することを示した (図 10 中段、

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

下段)。この性質はタンパク質の切断を光によりコントロールする技術となる。タンパク質を光によって切断する技術はこれまでに報告されていない。またこの切断はタンパク質内での β 脱離反応であるが、タンパク質内の β 脱離反応、あるいはアミド基が脱離基となる β 脱離反応はこれまでに報告されていない。

実施例D-1：珊瑚からの新規蛍光蛋白遺伝子(Momiji)の単離

(1) total RNA の抽出

蛍光を放つ珊瑚より蛍光蛋白遺伝子の単離を行った。材料にはアザミハナガタサンゴ (*Scolymia Vitiensis*) を用いた。アザミハナガタサンゴをハンマーで碎き、碎いたサンゴ 10 グラムに"TRIzol" (GIBCO BRL) を 15 ml 加えて攪拌し、1500 x g で 10 分間遠心した。上清にクロロホルム 3 ml を加え、15 秒間攪拌した後 3 分間静置した。7500 x g で 15 分間遠心した。上清にイソプロパノール 7.5 ml を加え、15 秒間攪拌した後 10 分間静置した。17000 x g で 10 分間遠心した。上清を捨て 70% エタノールを 6 ml 加えて、17000 x g で 10 分間遠心した。上清を捨て沈殿を DEPC 水 200 μ l で溶解した。DEPC 水で溶解した total RNA を 100 倍に希釈して O.D. 260 と O.D. 280 の値を測定して RNA 濃度を測った。230 μ g の total RNA を得た。

(2) First strand cDNA の合成

total RNA 3 μ g を使用し、First strand cDNA の合成キット"Ready To Go" (Amersham Pharmacia) により cDNA (33 μ l) を合成した。

(3) Degenerated PCR

合成した First strand cDNA (33 μ l) のうち 3 μ l を鋳型として PCR を行った。プライマーのデザインは既知の蛍光蛋白のアミノ酸配列を見比べて、似ている部分を抜き出し、塩基配列に変換し直して作製した。

使用プライマー

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

5'- ATCAAGNTNWRATGGAAGG -3' (primer1) (配列番号 27)

5'- acVggDccatYDgVaagaaaRtt-3' (primer2) (配列番号 28)

R は A 又は G を示し、Y は C 又は T を示し、V は A, C 又は G を示し、D は A, G 又は T を示す。

PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X 10 taq バッファー	5 μ l
2.5m M dNTPs	4 μ l
100 μ M primer1	1 μ l
100 μ M primer2	1 μ l
ミリ Q	35 μ l
taq polymerase(5 U/ μ l)	1 μ l

PCR 反応条件

94 °C 1 分(PAD)

94 °C 30 秒 (変性)

52 °C 30 秒 (プライマーの鋳型へのアニーリング)

72 °C 1 分 (プライマー伸長)

上記 3 ステップを 30 サイクル行い、アニーリング温度を 1 サイクルごとに 0.3 °C 下げた。30 サイクル時の温度は 43 °C。

72 °C 7 分 (最後の伸長)

4 °C で保持

一回目の PCR 反応で得られた増幅産物 1 μ l をテンプレートとして、もう一度同じ条件で PCR を行った。アガロースゲル電気泳動で予想された大きさの 350 bp のバンドを切り出し、精製した。

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

(4) サブクローニング及び塩基配列の決定

精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションして X-gal 存在下でブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。得られた塩基配列を他の蛍光蛋白遺伝子の塩基配列と比較してその DNA 塩基配列が蛍光蛋白由来のものであるかを判断した。蛍光蛋白遺伝子の一部であると判断したものに関して、5'-RACE 法および 3'-RACE 法による遺伝子全長のクローニングを行った。

(5) 5'-RACE 法

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 5'側の塩基配列を決定するために 5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO BRL) を用いて、5'-RACE 法を行った。鋳型として 1) で調整した total RNA を 3 μ g 使用した。DC-tailed cDNA の一回目の増幅には

5'-ggccacgcgtcgactagtagcggiiggggiiggg-3' (primer3) (配列番号 29)

5'- AGTTCACACCATGATATTCAATATCATA -3' (primer4) (配列番号 30)

のプライマーを用いた。

I はイノシンを示す。

二回目の増幅には

5'-ggccacgcgtcgactagtag-3' (primer5) (配列番号 31)

5'-TCTTCGTAAGTCATGCTTCGTTC-3' (primer6) (配列番号 32)

のプライマーを用いた。PCR 反応条件等はキットのプロトコールに準じた。

アガロースゲル電気泳動で、増幅された 400 bp のバンドを切り出し、精製した。精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションして X-gal 存在下でブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。

(6) 3'-RACE 法

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 3'側部分は、(4) の塩基配列決定で得られた情報を基に作製したプライマーとオリゴ dT プライマーの PCR で得た。鋳型として (2) で調整した first strand cDNA を 3 μ l 使用した。

作成したプライマーは 5'-GGTATTCGCCAAATACCCAAA-3'(primer7) (配列番号 33)

PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X 10 taq バッファー	5 μ l
2.5 mM dNTPs	4 μ l
20 μ M primer3	1 μ l
10 μ M oligo dT primer	1 μ l
ミリ Q	35 μ l
taq polymerase(5 U/ μ l)	1 μ l

PCR 反応条件

94 $^{\circ}$ C 1 分(PAD)

94 $^{\circ}$ C 30 秒(変性)

52 $^{\circ}$ C 30 秒(プライマーの鋳型へのアニーリング)

72 $^{\circ}$ C 1 分 (プライマー伸長)

上記 3 ステップを 30 サイクル行った。

72 $^{\circ}$ C 7 分 (最後の伸長)

4 $^{\circ}$ C で保持

アガロースゲル電気泳動で、増幅された 500 bp のバンドを切り出し、精製した。

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションして X-gal 存在下でブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。

(7) 全長 cDNA の取得

得られた全長の塩基配列より蛍光蛋白質をコードするオープンリーディングフレームを決定した。N 末端、C 末端に相当する部分でプライマーを作製し、(2) で調製した First strand cDNA を鋳型として PCR を行って全長の cDNA を得た。このクローンを Momiji と命名した。Momiji のアミノ酸配列を配列表の配列番号 9 に記載し、塩基配列を配列表の配列番号 10 に記載する。

使用プライマー

5'- CCCGATCCGACCATGGTGAGTGTGATTAAGGACGAAATG -3' (primer8) (配列番号 34)

5'- CCGCTCGAGTTGTTGTTGTTTCTCTTTGTCCTG -3' (primer9) (配列番号 35)

PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X 10 pyrobest バッファー	5 μ l
2.5 mM dNTPs	4 μ l
20 μ M primer4	1 μ l
20 μ M primer5	1 μ l
ミリ Q	35 μ l
pyrobest polymerase (5 U/ μ l)	1 μ l

PCR 反応条件

94 $^{\circ}$ C 1 分 (PAD)

94 $^{\circ}$ C 30 秒 (変性)

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

52 °C 30 秒 (プライマーの鋳型へのアニーリング)

72 °C 1 分 (プライマー伸長)

上記 3 ステップを 30 サイクル行った。

72 °C 7 分 (最後の伸長)

4 °C で保持

実施例 D-2 : 大腸菌での蛋白発現

実施例 D-1 (7) で増幅された 700 bp のバンドをアガロースゲルの電気泳動で、切り出し、精製して pET28 vector (Novagen) の Nco I、Xho I 部位に挿入して、大腸菌株 (JM109-DE3) で発現させた。C 末端に His-tag が付くようにコンストラクトし、産生させた蛋白は Ni-Agarose gel (QIAGEN) で精製した。精製の方法は付属のプロトコールに準じた。以下、実施例 D-3 で、精製した蛋白 (Momiji) の性質を解析した。

実施例 D-3 : 蛍光蛋白の解析

(1) 蛍光特性の解析

蛍光蛋白 (Momiji) 20 μ M、50 mM HEPES pH 7.4、150 mM KCl 溶液を用いて、吸収スペクトルを測定した。さらに上記の緩衝液で 20 倍希釈し、蛍光スペクトル及び励起スペクトルを測定した。別に Bradford 法で求めた蛋白質濃度と吸収スペクトルのピークの値より、508 nm と 578 nm におけるモル吸光係数を計算した。450 nm の吸収が 0.002 となるように蛍光蛋白を同緩衝液で希釈し、450 nm で励起した時の蛍光スペクトルを測定した。EGFP (CLONTECH) を同様に 450 nm の吸収が 0.002 となるようにして蛍光スペクトルを測定し、両スペクトルの面積比から今回クローニングされた蛍光蛋白の蛍光の量子収率を求めた。EGFP の蛍光の量子収率を 0.6 とした。測定結果等は表 4 及び図 11 に示す。

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

表 4

	Momiji	EGFP
励起極大	508nm, 578nm	490nm
蛍光極大	518nm, 588nm	509nm
モル吸光係数	102250 (508nm), 76950 (578nm)	48850(490nm)
量子収率(蛍光)	0.43 (518nm), 0.51 (588nm)	0.600
pH感受性	pKa=5.8 (508nm), pKa=6.5 (578nm)	pKa=6.0
アミノ酸数	229a.a.	238a.a.

(2) UV によるスペクトル変化の測定

本発明の蛍光蛋白 (Momiji) は UV (365 nm 付近) の照射により、蛍光、及び、吸収スペクトルが変化するため、その変化を測定した。蛍光蛋白を 50 mM HEPES pH 7.4、150 mM KCl 溶液で希釈して、365 nm の光を照射し、365 nm で励起した時の蛍光スペクトルを測定した。また蛍光蛋白 20 μ M、50 mM HEPES pH 7.4、150 mM KCl 溶液を用いて、365 nm の光を照射した後の吸収スペクトルを測定した。測定結果等は図 1 3 及び図 1 4 に示す。なお、蛍光スペクトルと吸収スペクトルの測定を行ったときの 365 nm の光量が違うため、蛍光スペクトルと吸収スペクトルの変化と時間は一致しない。

(3) pH 感受性の測定

pH 4 から 11 の緩衝液で吸収スペクトルをとり pH 感受性 (pKa) を測定した。

各 pH の緩衝液は次の通り、

pH 4、5 : 酢酸バッファー

pH 6、11 : リン酸バッファー

pH 7、8 : HEPES バッファー

pH 9、10 : グリシンバッファー

測定結果等は表 4 及び図 1 2 に示す。

実施例 D-4 : Momiji の蛍光特性の改良

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

Momiji の 86 番目のグルタミン酸 (E) をリジン (K) に 111 番目のアスパラギン酸 (D) をグルタミン酸 (E) に、142 番目のグルタミン (Q) をプロリン (P) に、203 番目のアルギニン (R) をヒスチジン (H) にアミノ酸置換する事によりモル吸光係数の値が 102250 (508nm) から 127200 (505nm) に上昇し、緑から赤への紫 (外) 光照射依存的に蛍光特性が変わる性質を保持したまま、緑の蛍光が明るくなった (表 5、図 15 及び 21)。また、紫 (外) 光照射依存的に蛍光特性が変わった赤い蛍光を放つ分子は、野生型 (Momiji) のそれにくらべて低い pH に抵抗性をもった (図 17 及び 18)。この変異体を Momiji2 とした。Momiji2 のアミノ酸配列及び塩基配列を配列表の配列番号 11 及び 12 にそれぞれ示す。

表 5 : 蛍光特性変異体

変異体	UV照射前励起極大	UV照射前蛍光極大	UV照射後励起極大	UV照射後蛍光極大	モル吸光係数(緑)	モル吸光係数(赤)
Momiji	508 nm	518 nm	578 nm	588 nm	102250 (508 nm)	76950 (578 nm)
Momiji2	505 nm	518 nm	576 nm	587 nm	127200 (505 nm)	51450 (576 nm)
Momiji4	507 nm	518 nm	583 nm	596 nm	27200 (507 nm)	32050 (583 nm)

実施例 D-5 : Momiji の光照射依存的な蛍光特性の改良

Momiji の 197 番目のイソロイシン (I) をメチオニン (M) にアミノ酸置換した。この変異体を Momiji4 とした。Momiji4 のアミノ酸配列及び塩基配列を配列表の配列番号 13 及び 14 にそれぞれ示す。紫 (外) 光照射依存的な緑から赤への蛍光変化が 365 nm 光照射後 1 分から Momiji4 では観測されたが、野生型 (Momiji) に於いては 365 nm 光照射後 10 分が Momiji4 の 1 分間照射に相当し、明らかに Momiji4 が野生型 (Momiji) より光照射依存的蛍光特性変換効率が高いことを示した (図 16、20 及び 22)。HeLa 細胞に Momiji、Momiji4 を発現させて、細胞内での 410 nm 光照射による緑から赤への蛍光特性の変化 (Red/Green) を測定した結果も、光照射依存的蛍光特性変換効率が Momiji4 のほうが良いことを示した。紫 (外) 光照射依存的に蛍光特性が変わった赤い蛍光を放つ分子は、野生型 (Momiji) のそれにくらべて低い pH に抵抗性を持ち、特性変換光照射前の緑の

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

蛍光を放つ分子は低い pH に感受性となった(図 17 及び 19)。

実施例 D-6 : Momiji の二量体の作製

12.5% アクリルアミドゲルを用いて Momiji を煮沸せずに電気泳動 (Pseudonative SDS/PAGE) を行くと Momiji は四量体を形成していることを示した。Momiji の 11 番目のアスパラギン (N) をアルギニン (R) に、29 番目のロイシン (L) をトレオニン (T) に、122 番目のチロシン (Y) をグルタミン酸 (E) に、136 番目のリジン (K) をアスパラギン (N) に、138 番目のグルタミン (Q) をロイシン (L) に、142 番目のグルタミン (Q) をプロリン (P) に、159 番目のアスパラギン (N) をアスパラギン酸 (D) に、161 番目のアラニン (A) をセリン (S) に、190 番目のチロシン (Y) をトレオニン (T) に、192 番目のフェニルアラニン (F) をチロシン (Y) に、196 番目のシステイン (C) をセリン (S) にアミノ酸置換し、224 番目から 229 番目までの 6 アミノ酸を削除する事により二量体となった(図 24)。Momiji と同様に緑から赤への紫 (外) 光照射依存的に蛍光特性が変わる性質を保持していた(図 25)。この変異体を d16 とした。d16 のアミノ酸配列及び塩基配列を配列表の配列番号 15 及び 16 にそれぞれ示す。

実施例 D-7 : Momiji の単量体の作製

Momiji の 11 番目のアスパラギン (N) をアルギニン (R) に、29 番目のロイシン (L) をトレオニン (T) に、95 番目のイソロイシン (I) をトレオニン (T) に、101 番目のイソロイシン (I) をバリン (V) に、103 番目のイソロイシン (I) をトレオニン (T) に、122 番目のチロシン (Y) をグルタミン酸 (E) に、124 番目のバリン (V) をトレオニン (T) に、138 番目のグルタミン (Q) をロイシン (L) に、142 番目のグルタミン (Q) をプロリン (P) に、159 番目のアスパラギン (N) をアスパラギン酸 (D) に、161 番目のアラニン (A) をセリン (S) に、174 番目のフェニルアラニン (F) をメチオニン (M) に、190 番目のチロシン (Y) をトレオニン (T) に、192 番目のフェニルアラニン (F) をチロシン (Y) に、196 番目

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

のシステイン (C) をセリン (S) に、212 番目のフェニルアラニン (F) をチロシン (Y) にアミノ酸置換し、224 番目から 229 番目までの 6 アミノ酸を削除する事により単量体となった(図 2 4)。Momiji と同様に緑から赤への紫 (外) 光照射依存的に蛍光特性が変わる性質を保持していた(図 2 6)。この変異体を m16 とした。m16 のアミノ酸配列及び塩基配列を配列表の配列番号 1 7 及び 1 8 にそれぞれ示す

産業上の利用の可能性

本発明により、ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来の新規な色素蛋白質が提供されることになった。本発明の色素蛋白質は所定の吸光特性を有し、また pH 感受性が低いことから、分子生物学的分析において有用である。また、本発明の色素蛋白質の吸収度 (モル吸光係数) は著しく大きいため、光エネルギーの高効率な変換が可能である。また、遺伝子改変技術によって本発明の色素蛋白質の量子収率を 1 に近づけることも可能であり、その場合、新規な蛍光蛋白質を作製することができる。

また本発明により、ヒュサンゴ (*Trachyphyllia geoffroyi*) に由来する新規な一次構造を有する蛍光蛋白質を提供される。本発明の蛍光蛋白質は、紫外光によって色が緑色から赤色に変わることを特徴とし、光によって特定の細胞や器官をマーキング (optical marking) することが可能である。さらに本発明により、アザミハナガタサンゴ (*Scolymia Vitiensis*) に由来する新規な一次構造を有する蛍光蛋白質を提供される。本発明の蛍光蛋白質は、紫外光によって色が緑色から赤色に変わることを特徴とし、光によって、特定の細胞、器官又は蛋白質をマーキング (optical marking) することが可能である。また、本発明の蛍光蛋白質によれば、紫外光によって非常に簡単に効率よく特異的に緑色から赤色への変換が可能であり、色変換の前後の緑色及び赤色の両状態が非常に安定で明るいため実用的である。

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

請求の範囲

1. ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来の下記の特性を有する色素蛋白質。

- (1) 吸収極大波長が 605 nm である；
- (2) 605 nm におけるモル吸光係数が 47550 である；
- (3) 光吸収特性の pH 感受性が pH 5～10 で安定である；

2. 以下の何れかのアミノ酸配列を有する色素蛋白質。

- (a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有するアミノ酸配列；

3. ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来の下記の特性を有する色素蛋白質。

- (1) 吸収極大波長が 553 nm である；
- (2) 553 nm におけるモル吸光係数が 25300 である；
- (3) 光吸収特性の pH 感受性が pH 5～10 で安定である；

4. 以下の何れかのアミノ酸配列を有する色素蛋白質。

- (a) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有するアミノ酸配列；

5. 請求項 1 から 4 の何れかに記載の蛋白質をコードする DNA。

6. 以下の何れかの DNA。

- (a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、
- (b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコ

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

ードするDNA：

7. 以下の何れかのDNA。

- (a) 配列番号3に記載のアミノ酸配列をコードするDNA；又は、
- (b) 配列番号3に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードするDNA：

8. 以下の何れかの塩基配列を有するDNA。

- (a) 配列番号2に記載の塩基配列；又は、
- (b) 配列番号2に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列：

9. 以下の何れかの塩基配列を有するDNA。

- (a) 配列番号4に記載の塩基配列；又は、
- (b) 配列番号4に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列：

10. 請求項6から9の何れかに記載のDNAを有する組み換えベクター。

11. 請求項6から10の何れかに記載のDNA又は請求項10に記載の組み換えベクターを有する形質転換体。

12. 請求項1から4の何れかに記載の色素蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛋白質。

13. 請求項1から4の何れかに記載の色素蛋白質をアクセプター蛋白質として用いてFRET（蛍光共鳴エネルギー転移）法を行うことを特徴とする、生理活性物質の分析方法。

14. 請求項1から4の何れかに記載の色素蛋白質、請求項5から9の何れかに記載のDNA、請求項10に記載の組み換えベクター、請求項11に記載の形質転換体、又は請求項12に記載の融合蛋白質を含む、吸光試薬キット。

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

15. ヒュサンゴ (*Trachyphyllia geoffroyi*) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質。

- (1) 紫外線の照射により緑色から赤色に変化し、励起極大波長が 508 nm (緑) 及び 572 nm (赤) であり、蛍光極大波長が 518 nm (緑) 及び 581 nm (赤) である；
- (2) 508 nm におけるモル吸光係数 (緑) が $98800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、572 nm におけるモル吸光係数 (赤) が $60400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である；
- (3) 量子収率が 0.80 (緑) 及び 0.33 (赤) である；及び
- (4) 緑色及び赤色の pH 感受性についての pK_a は共に 5.7 である；

16. 以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。

- (a) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、かつ蛍光を有するアミノ酸配列；

17. 配列番号 7 に記載のアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。

18. アザミハナガタサンゴ (*Scolymia Vitiensis*) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質。

- (1) 紫外線の照射により緑色から赤色に変化し、励起極大波長が 508 nm (緑) 及び 578 nm (赤) であり、蛍光極大波長が 518 nm (緑) 及び 588 nm (赤) である；
- (2) 508 nm におけるモル吸光係数 (緑) が $102250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、578 nm におけるモル吸光係数 (赤) が $76950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である；
- (3) 量子収率 (蛍光) が 0.43 (緑) 及び 0.51 (赤) である；及び
- (4) 緑色 (508 nm) の pH 感受性について pK_a が 5.8 であり、赤色 (578 nm) の pH 感受性について pK_a が 6.5 である。

19. 以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

- (a) 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、かつ蛍光を有するアミノ酸配列：

20. 配列番号 11、13、15 又は 17 の何れかに記載のアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。

21. 以下の何れかの DNA。

- (a) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、
- (b) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列をコードし、かつ蛍光蛋白質をコードする DNA：

- (c) 配列番号 6 に記載の塩基配列を有する DNA；又は、
- (d) 配列番号 6 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ蛍光蛋白質をコードする DNA：

22. 以下の何れかの DNA。

- (a) 配列番号 7 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、
- (b) 配列番号 8 に記載の塩基配列を有する DNA。

23. 以下の何れかの DNA。

- (a) 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、
- (b) 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列をコードし、かつ蛍光蛋白質をコードする DNA：

- (c) 配列番号 10 に記載の塩基配列を有する DNA；又は、
- (d) 配列番号 10 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ蛍光蛋白質をコードする DNA：

24. 以下の何れかの DNA。

- (a) 配列番号 11、13、15 又は 17 に記載のアミノ酸配列をコードする D

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

NA ; 又は、

(b) 配列番号 12、14、16 又は 18 に記載の塩基配列を有する DNA。

25. 請求項 21 から 24 の何れかに記載の DNA を有する組み換えベクター。

26. 請求項 21 から 24 の何れかに記載の DNA 又は請求項 25 に記載の組み換えベクターを有する形質転換体。

27. 請求項 15 から 20 の何れかに記載の蛍光蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛍光蛋白質。

28. 他の蛋白質が細胞内に局在する蛋白質である、請求項 27 に記載の融合蛍光蛋白質。

29. 他の蛋白質が細胞内小器官に特異的な蛋白質である、請求項 27 又は 28 に記載の融合蛍光蛋白質。

30. 請求項 27 から 29 の何れかに記載の融合蛍光蛋白質を細胞内で発現させることを特徴とする、細胞内における蛋白質の局在または動態を分析する方法。

31. 請求項 15 から 20 の何れかに記載の蛍光蛋白質、請求項 21 から 24 の何れかに記載の DNA、請求項 25 に記載の組み換えベクター、請求項 26 に記載の形質転換体、又は請求項 27 から 29 の何れかに記載の融合蛍光蛋白質を含む、蛍光試薬キット。

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

図 1

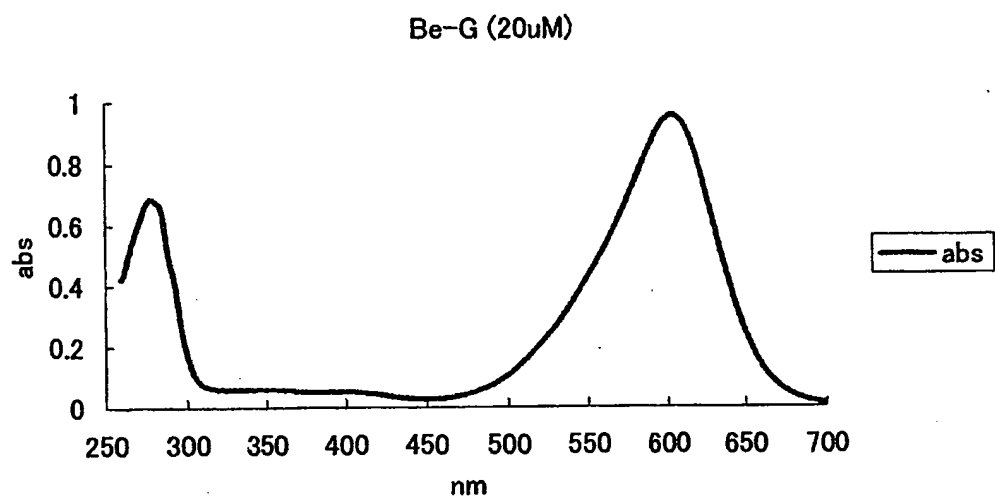
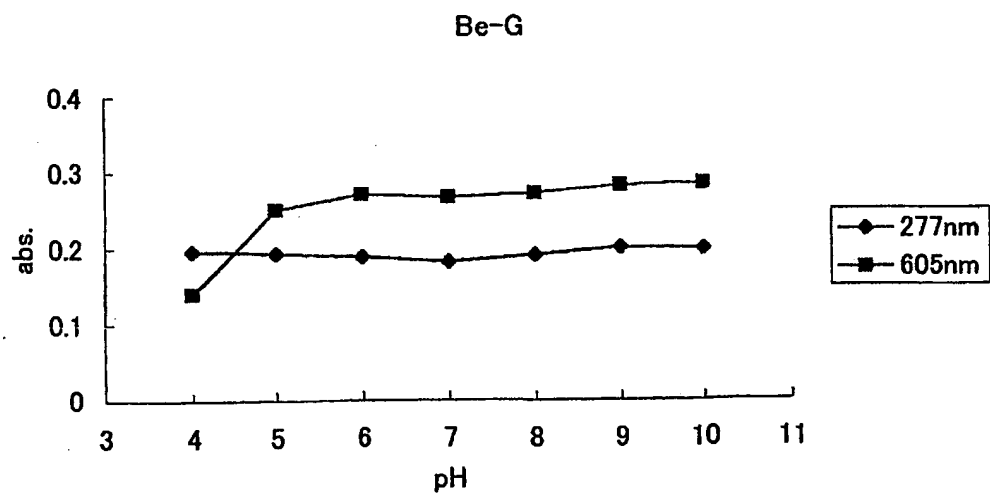


図 2



WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

图 3

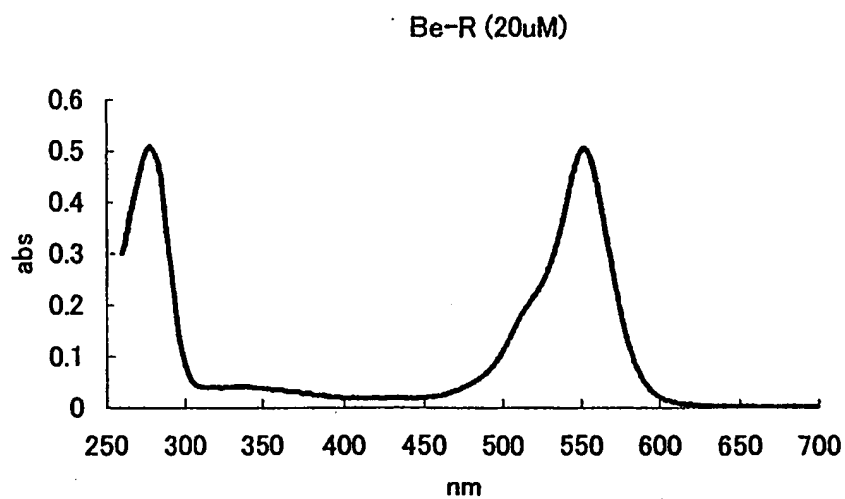
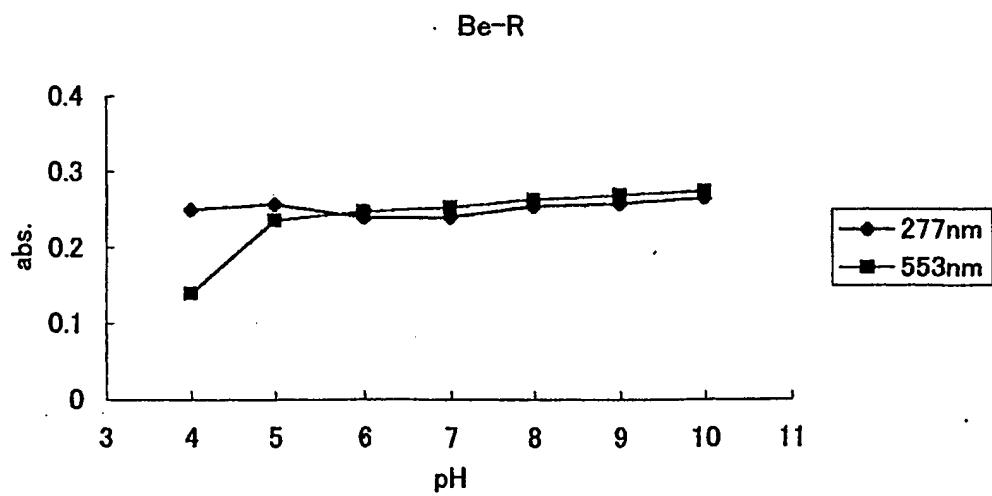


图 4



WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

図 5

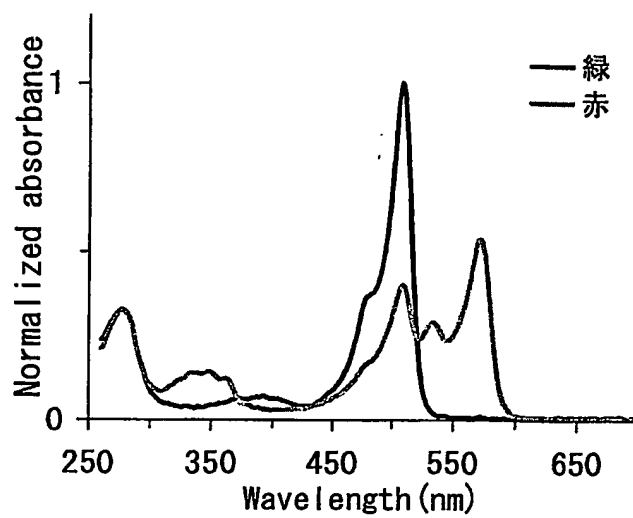
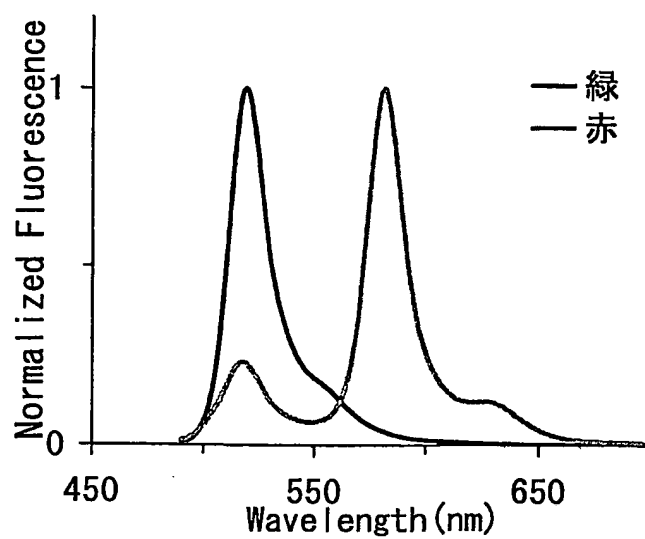


図 6



3/15

差替え用紙 (規則26)

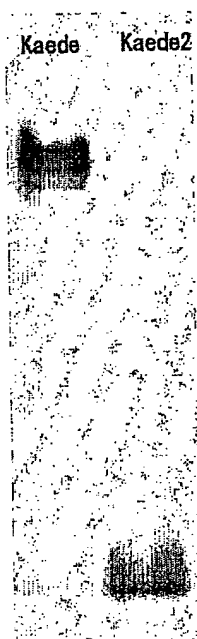
WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

☒ 7



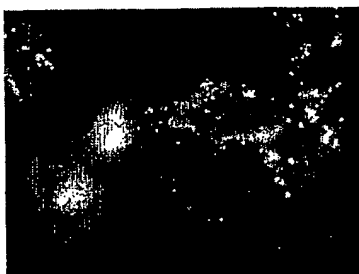
☒ 8



WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

図 9



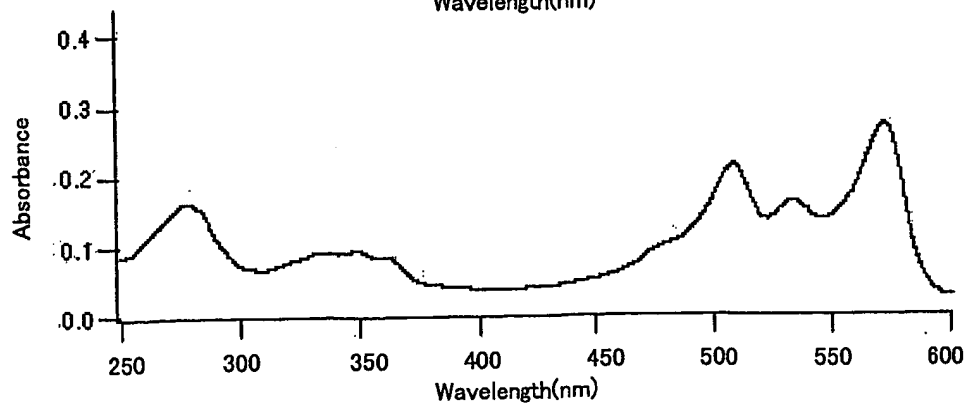
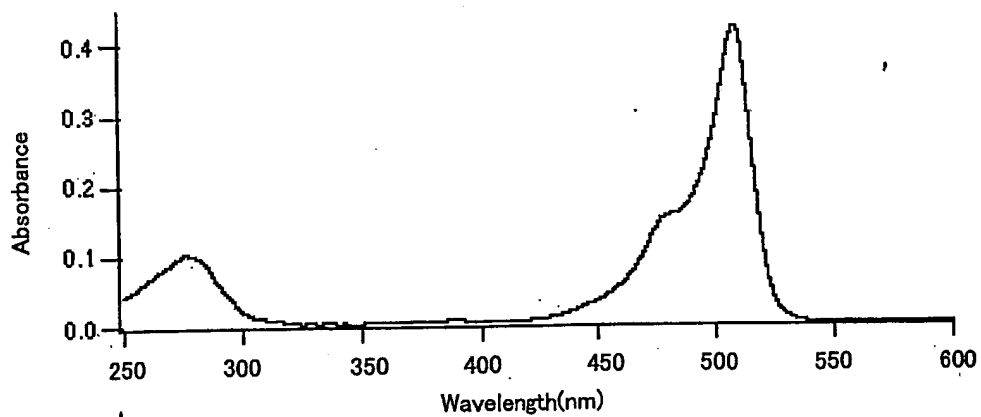
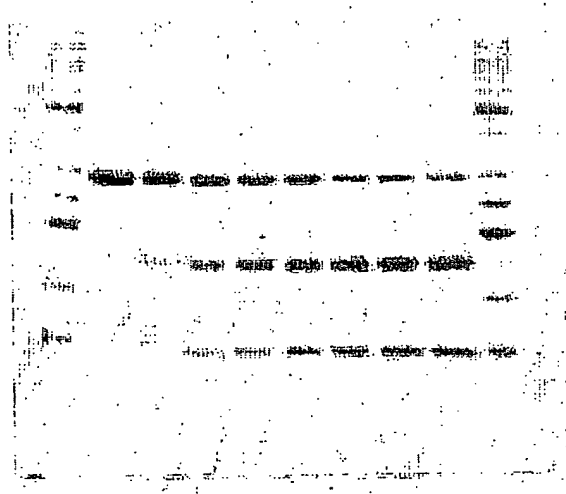
WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

図 10

紫外線照射時間(分)

0 20 40 60 80 100 120 140



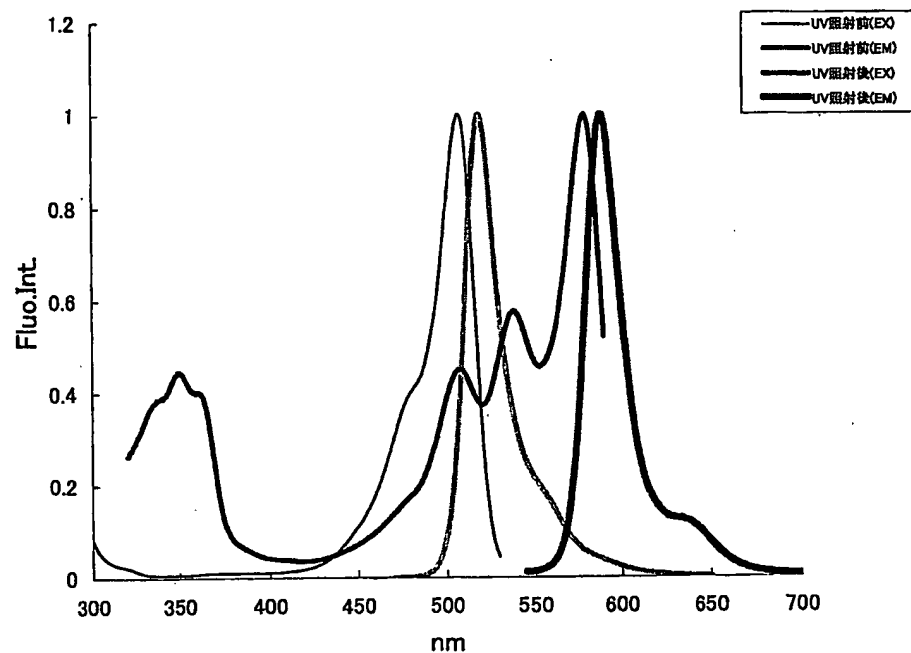
5/1/15

差替え用紙(規則26)

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

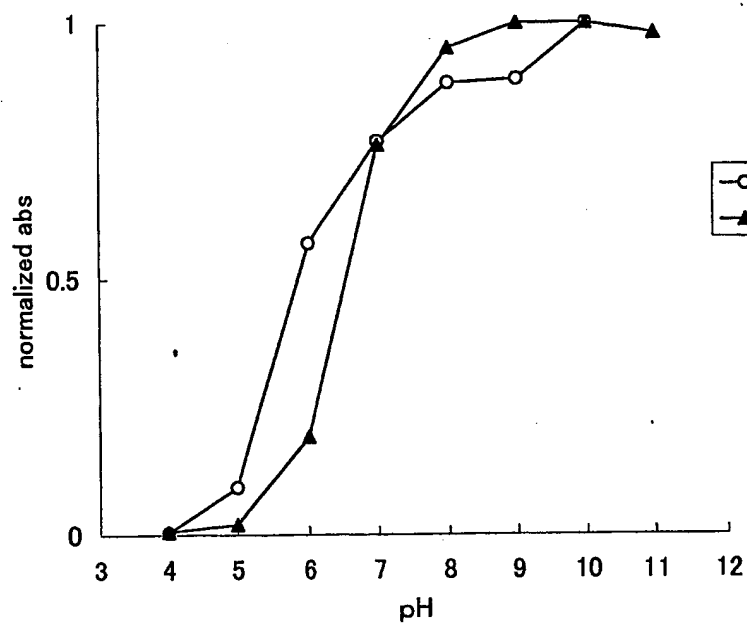
図 11



WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

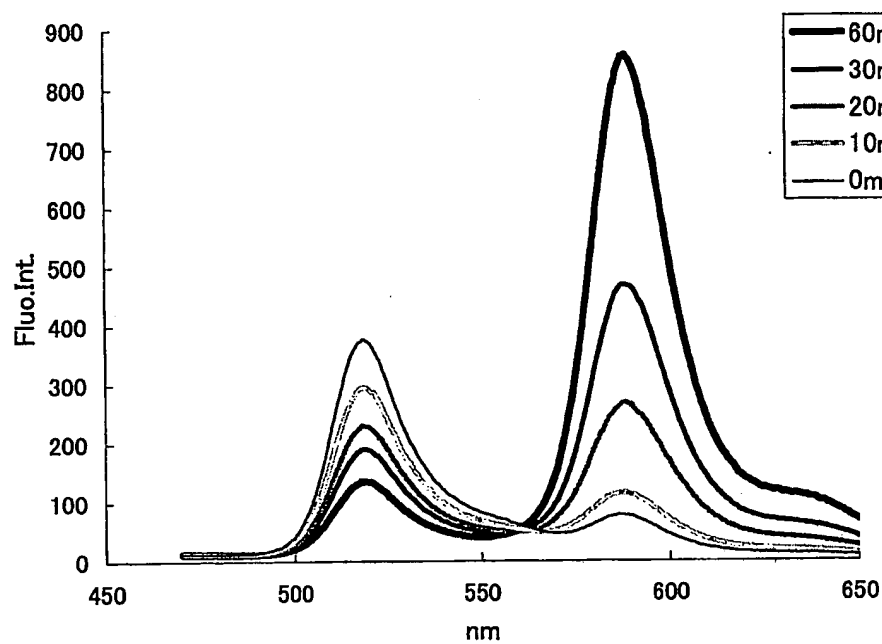
図 12



WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

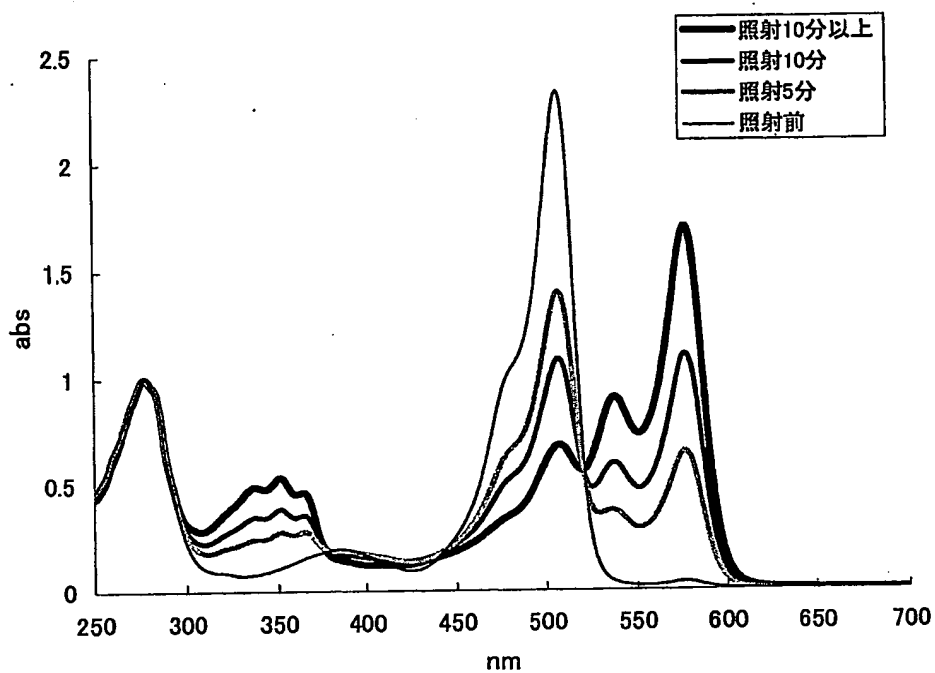
図 13



WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

図 14



WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

図 15

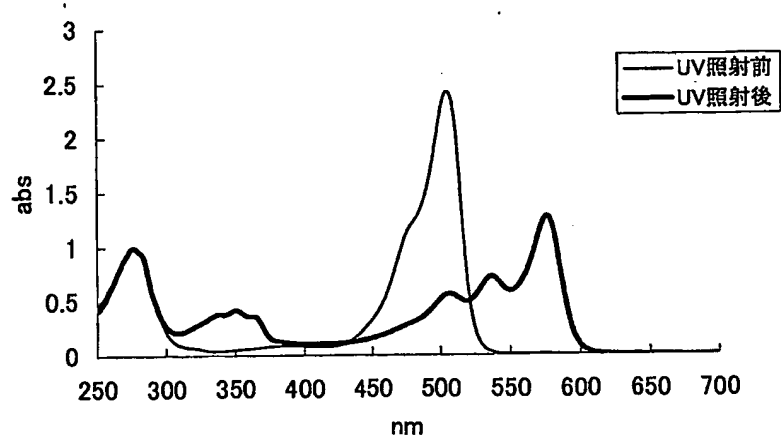
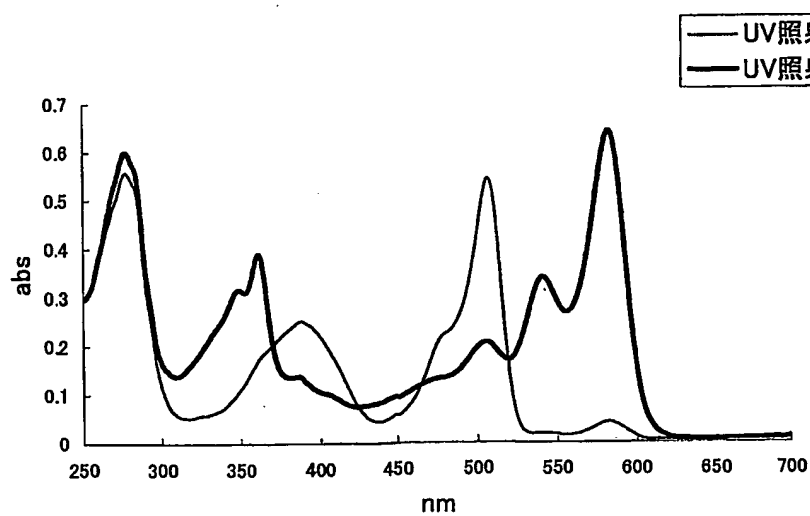


図 16



WO 2004/018671

日 本 特 許 庁 JP2003/010628 10. 03

図 17

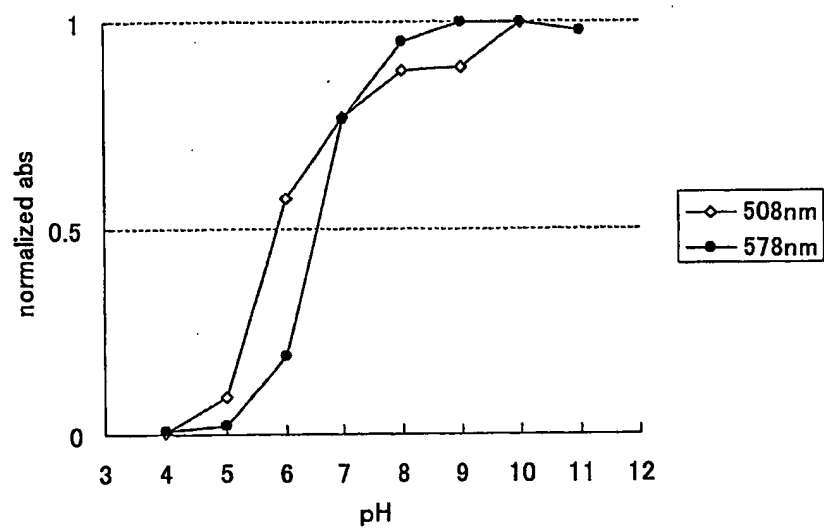
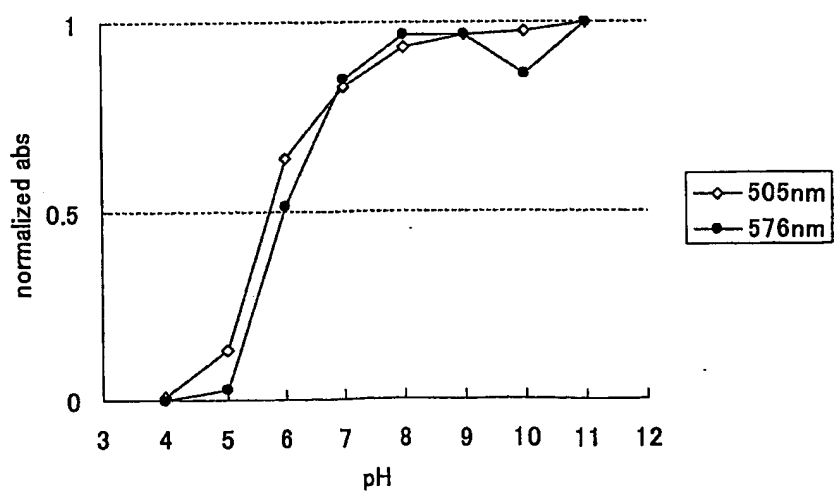


図 18



WO 2004/018671

H 4 PCT/JP2003/010628.0 03

図 19

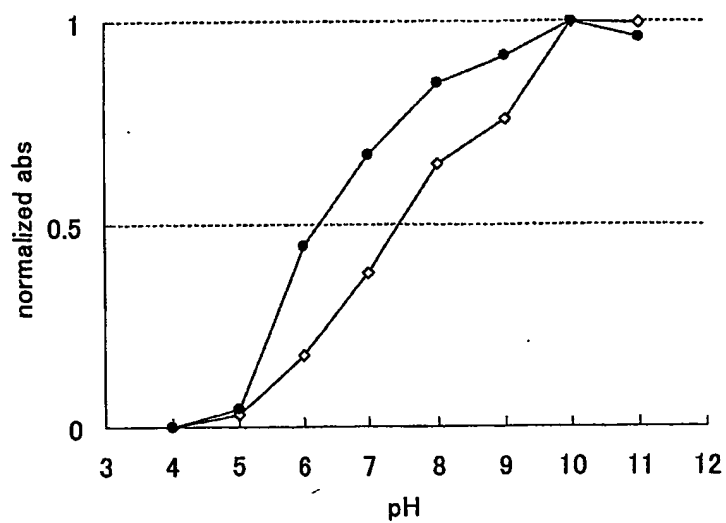
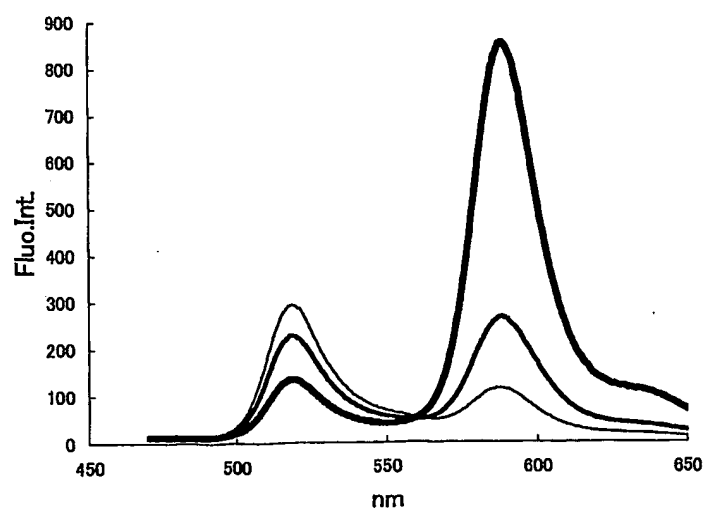


図 20



12/15

差替え用紙 (規則26)

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628
日本国特許庁 01.10.1

図 21

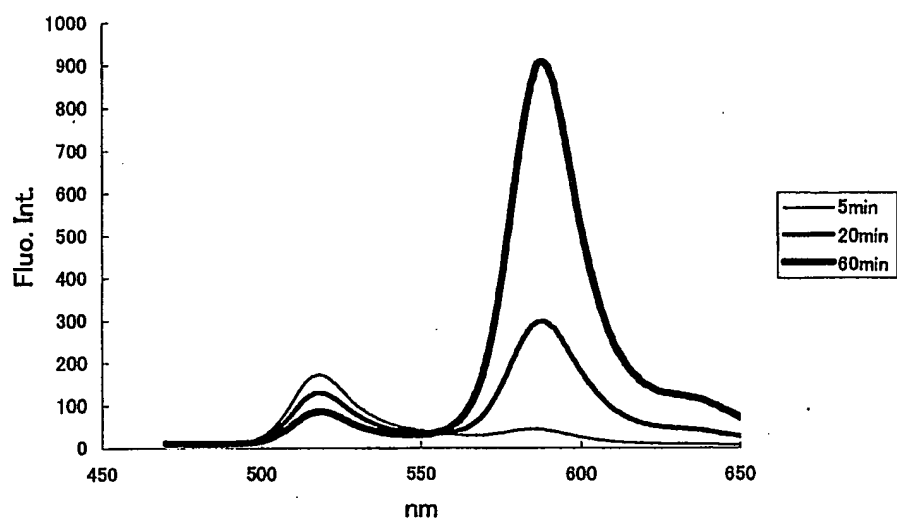
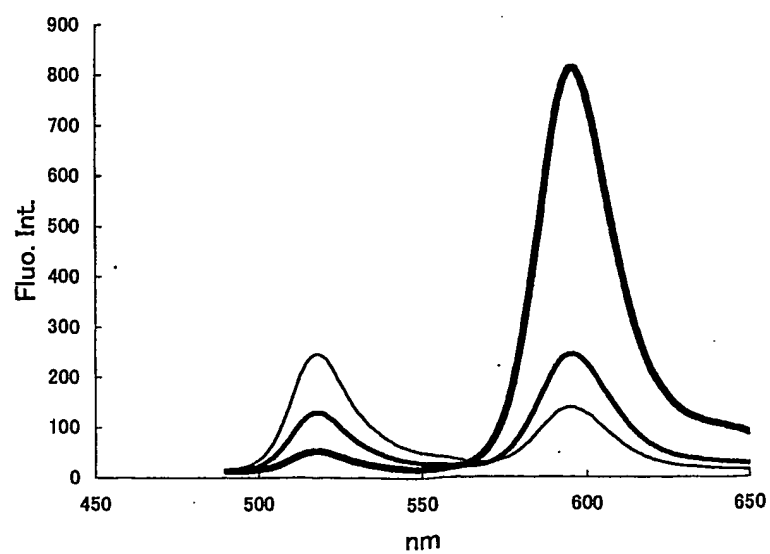
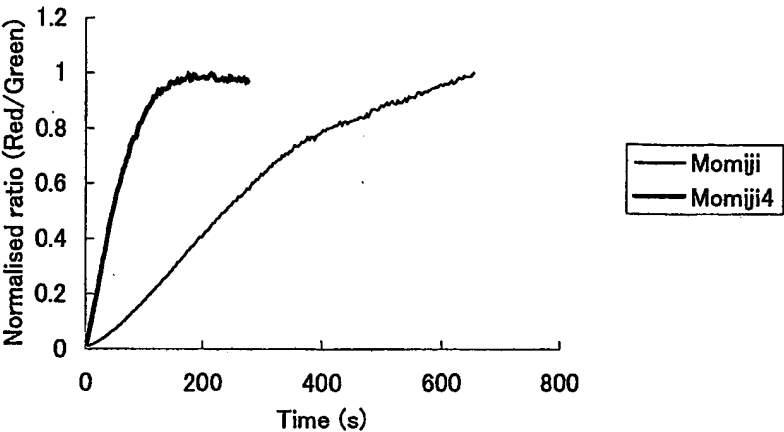


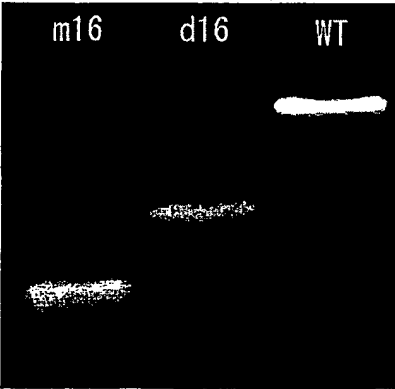
図 22



23



24



WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628.10.03

図 25

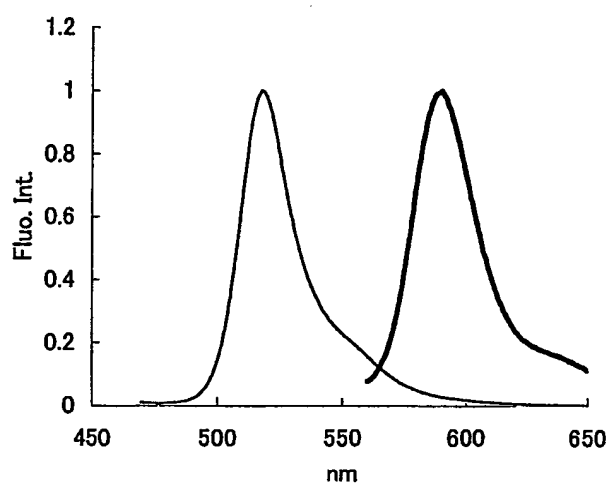
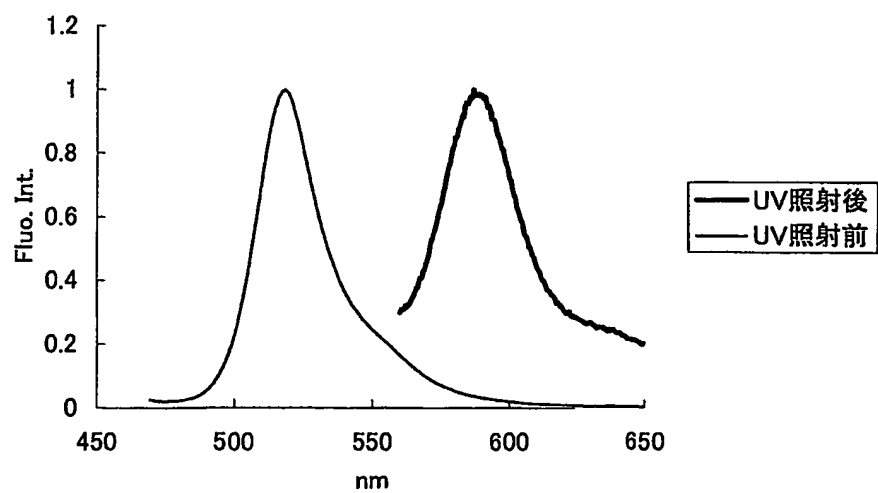


図 26



WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN et al

<120> Chromo protein and fluorescent protein

<130> 35

<160> A31519A

<210> 1

<211> 229

<212> PRT

<213> Anthopleura inornata

<400> 1

Met Ala Thr Leu Val Lys Glu Thr Met Arg Ile Lys Met Ser Met Glu

1 5 10 15

Gly Thr Val Asn Gly His His Phe Lys Cys Glu Gly Gln Gly Glu Gly

20 25 30

Lys Pro Phe Glu Gly Tyr Gln Val Glu Lys Ile Arg Val Thr Glu Gly

35 40 45

Gly Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Thr Leu Thr Pro Cys Trp Met Tyr

50 55 60

Gly Ser Lys Thr Phe Ile Lys His Thr Ser Gly Ile Pro Asp Tyr Phe

65 70 75 80

Lys Glu Ser Leu Pro Glu Gly Phe Thr Trp Glu Arg Thr Gln Ile Tyr

85 90 95

Glu Asp Gly Gly Cys Leu Thr Ile His Gln Asp Thr Ser Met Gln Gly

100 105 110

Asp Cys Phe Ile Phe Lys Ile Lys Val Ile Gly Thr Asn Phe Pro Ala

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

115 120 125
 Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Ala Gly Trp Glu Pro Cys Val
 130 135 140
 Glu Met Leu Tyr Pro Arg Ala Gly Val Leu Cys Gly Gln Ser Leu Met
 145 150 155 160
 Ala Leu Lys Cys Lys Asp Gly Asn His Leu Thr Cys His Leu Arg Thr
 165 170 175
 Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Ala Gly Gln Lys Met Pro Glu Phe His Phe
 180 185 190
 Gly Asp His Arg Ile Glu Ile Leu Lys Glu Glu Glu Gln Gly Met Arg
 195 200 205
 Ile Glu Gln Tyr Glu Ala Ala Val Ala Arg Tyr Cys Glu Ala Pro Ser
 210 215 220
 Arg Leu Gly His His
 225

<210> 2

<211> 690

<212> DNA

<213> Anthopleura inornata

<400> 2

atg gct acc ttg gtt aaa gaa act atg cgc atc aag atg agt atg gaa 48
 Met Ala Thr Leu Val Lys Glu Thr Met Arg Ile Lys Met Ser Met Glu
 1 5 10 15
 ggg acg gtt aat gga cac cac ttc aag tgt gaa gga caa gga gag ggc 96
 Gly Thr Val Asn Gly His His Phe Lys Cys Glu Gly Gln Gly Glu Gly

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

20 25 30
aag cct ttt gaa ggt tac cag gtc gaa aag att aga gtt act gaa gga 144
Lys Pro Phe Glu Gly Tyr Gln Val Glu Lys Ile Arg Val Thr Glu Gly
35 40 45
ggt ccg cta ccc ttt gcg tac gat act ttg aca cct tgc tgg atg tat 192
Gly Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Thr Leu Thr Pro Cys Trp Met Tyr
50 55 60
gga agt aaa acc ttc atc aag cat aca tca gga att ccc gat tac ttc 240
Gly Ser Lys Thr Phe Ile Lys His Thr Ser Gly Ile Pro Asp Tyr Phe
65 70 75 80
aag gag tct ctt cct gaa ggc ttt act tgg gaa aga acg caa atc tac 288
Lys Glu Ser Leu Pro Glu Gly Phe Thr Trp Glu Arg Thr Gln Ile Tyr
85 90 95
gag gat gga ggc tgt ctt act att cac cag gac aca agc atg cag gga 336
Glu Asp Gly Gly Cys Leu Thr Ile His Gln Asp Thr Ser Met Gln Gly
100 105 110
gat tgt ttt att ttc aag ata aaa gtc att ggt acc aac ttt cct gcc 384
Asp Cys Phe Ile Phe Lys Ile Lys Val Ile Gly Thr Asn Phe Pro Ala
115 120 125
aat ggt ccc gtg atg cag aag aaa aca gca gga tgg gag cca tgc gtt 432
Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Ala Gly Trp Glu Pro Cys Val
130 135 140
gag atg ctt tat cct cgt gcc ggt gtc ttg tgt gga cag tcg ttg atg 480
Glu Met Leu Tyr Pro Arg Ala Gly Val Leu Cys Gly Gln Ser Leu Met
145 150 155 160
gcc ctg aaa tgc aag gat ggc aac cac ctg acg tgc cat ctg cga act 528

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

Ala Leu Lys Cys Lys Asp Gly Asn His Leu Thr Cys His Leu Arg Thr
165 170 175
acc tac agg tcc aga aag gca gga caa aaa atg cca gag ttc cat ttc 576
Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Ala Gly Gln Lys Met Pro Glu Phe His Phe
180 185 190
ggg gat cat cgt att gag atc ctg aag gaa gaa gaa caa ggc atg cgt 624
Gly Asp His Arg Ile Glu Ile Leu Lys Glu Glu Glu Gln Gly Met Arg
195 200 205
att gaa caa tac gag gca gcg gtg gcg agg tac tgc gaa gct cca tcc 672
Ile Glu Gln Tyr Glu Ala Ala Val Ala Arg Tyr Cys Glu Ala Pro Ser
210 215 220
agg ctt gga cat cac taa 690
Arg Leu Gly His His
225

<210> 3

<211> 229

<212> PRT

<213> Anthopleura inornata

<400> 3

Met Ala Thr Leu Val Lys Glu Thr Met Arg Ile Lys Met Ser Met Glu
1 5 10 15
Gly Thr Val Asn Gly His His Phe Lys Cys Glu Gly Gln Gly Glu Gly
20 25 30
Lys Pro Phe Glu Gly Tyr Gln Val Glu Lys Ile Arg Val Thr Glu Gly
35 40 45

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

Gly Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Ala Pro Cys Cys Ser Tyr
50 55 60
Gly Ser Lys Thr Phe Ile Lys His Val Ser Gly Ile Pro Asp Tyr Phe
65 70 75 80
Lys Glu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Thr Trp Glu Arg Thr Gln Ile Tyr
85 90 95
Glu Asp Gly Gly Ser Leu Ser Ile His Gln Asp Thr Ser Leu Gln Gly
100 105 110
Asp Cys Phe Ile Tyr Lys Ile Lys Val Ile Gly Thr Asn Phe Pro Ala
115 120 125
Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Ala Gly Trp Glu Pro Cys Val
130 135 140
Glu Met Leu Tyr Pro Arg Ala Gly Val Leu Cys Gly Gln Ser Leu Met
145 150 155 160
Ala Leu Lys Cys Lys Asp Gly Asn His Leu Thr Cys His Leu Arg Thr
165 170 175
Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Ala Gly Gln Lys Met Pro Glu Phe His Phe
180 185 190
Gly Asp His Arg Ile Glu Ile Leu Lys Glu Glu Glu Gln Gly Met Arg
195 200 205
Ile Glu Gln Tyr Glu Ala Ala Val Ala Arg Tyr Cys Glu Ala Pro Ser
210 215 220
Arg Leu Gly His His
225

<210> 4

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

<211> 690

<212> DNA

<213> Anthopleura inornata

<400> 4

```
atg gct acc ttg gtt aaa gaa act atg cgc atc aag atg agt atg gaa 48
Met Ala Thr Leu Val Lys Glu Thr Met Arg Ile Lys Met Ser Met Glu
      1             5             10             15
ggg acg gtt aat gga cac cac ttc aag tgt gaa gga caa gga gag ggc 96
Gly Thr Val Asn Gly His His Phe Lys Cys Glu Gly Gln Gly Glu Gly
            20             25             30
aag cct ttt gaa ggt tac cag gtc gaa aag att aga gtt act gaa gga 144
Lys Pro Phe Glu Gly Tyr Gln Val Glu Lys Ile Arg Val Thr Glu Gly
            35             40             45
ggt ccg cta ccc ttt gcg tac gat att ttg gca cct tgc tgc tcg tat 192
Gly Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Ala Pro Cys Cys Ser Tyr
            50             55             60
gga agt aaa acc ttc atc aag cat gtc tcg gga atc ccc gat tac ttc 240
Gly Ser Lys Thr Phe Ile Lys His Val Ser Gly Ile Pro Asp Tyr Phe
            65             70             75             80
aag gag tcc ttc cct gaa ggc ttt act tgg gaa aga acg caa atc tac 288
Lys Glu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Thr Trp Glu Arg Thr Gln Ile Tyr
            85             90             95
gag gat gga ggc tct ctt tct att cac cag gac aca agc ctg cag gga 336
Glu Asp Gly Gly Ser Leu Ser Ile His Gln Asp Thr Ser Leu Gln Gly
            100            105            110
gat tgt ttt att tac aag atc aaa gtc att ggc acc aac ttt cct gcc 384
```

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

Asp Cys Phe Ile Tyr Lys Ile Lys Val Ile Gly Thr Asn Phe Pro Ala
 115 120 125
 aat ggt ccc gtg atg cag aag aaa aca gca gga tgg gag cca tgc gtt 432
 Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Ala Gly Trp Glu Pro Cys Val
 130 135 140
 gag atg ctt tat cct cgt gcc ggt gtc ttg tgt gga cag tcg ttg atg 480
 Glu Met Leu Tyr Pro Arg Ala Gly Val Leu Cys Gly Gln Ser Leu Met
 145 150 155 160
 gcc ctg aaa tgc aag gat ggc aac cac ctg acg tgc cat ctg cga act 528
 Ala Leu Lys Cys Lys Asp Gly Asn His Leu Thr Cys His Leu Arg Thr
 165 170 175
 acc tac agg tcc aga aag gca gga caa aaa atg cca gag ttc cat ttc 576
 Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Ala Gly Gln Lys Met Pro Glu Phe His Phe
 180 185 190
 ggg gat cat cgt att gag atc ctg aag gaa gaa gaa caa ggc atg cgt 624
 Gly Asp His Arg Ile Glu Ile Leu Lys Glu Glu Glu Gln Gly Met Arg
 195 200 205
 att gaa caa tac gag gca gcg gtg gcg agg tac tgc gaa gct cca tcc 672
 Ile Glu Gln Tyr Glu Ala Ala Val Ala Arg Tyr Cys Glu Ala Pro Ser
 210 215 220
 agg ctt gga cat cac taa 690
 Arg Leu Gly His His
 225

<210> 5

<211> 225

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

<212> PRT

<213> Trachyphyllia geoffroyi

<400> 5

Met Ser Leu Ile Lys Pro Glu Met Lys Ile Lys Leu Leu Met Glu Gly

1 5 10 15

Asn Val Asn Gly His Gln Phe Val Ile Glu Gly Asp Gly Lys Gly His

20 25 30

Pro Phe Glu Gly Lys Gln Ser Met Asp Leu Val Val Lys Glu Gly Ala

35 40 45

Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Ala Phe His Tyr Gly

50 55 60

Asn Arg Val Phe Ala Lys Tyr Pro Asp His Ile Pro Asp Tyr Phe Lys

65 70 75 80

Gln Ser Phe Pro Lys Gly Phe Ser Trp Glu Arg Ser Leu Met Phe Glu

85 90 95

Asp Gly Gly Val Cys Ile Ala Thr Asn Asp Ile Thr Leu Lys Gly Asp

100 105 110

Thr Phe Phe Asn Lys Val Arg Phe Asp Gly Val Asn Phe Pro Pro Asn

115 120 125

Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Leu Lys Trp Glu Ala Ser Thr Glu

130 135 140

Lys Met Tyr Leu Arg Asp Gly Val Leu Thr Gly Asp Ile Thr Met Ala

145 150 155 160

Leu Leu Leu Lys Gly Asp Val His Tyr Arg Cys Asp Phe Arg Thr Thr

165 170 175

Tyr Lys Ser Arg Gln Glu Gly Val Lys Leu Pro Gly Tyr His Phe Val

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

180 185 190
 Asp His Cys Ile Ser Ile Leu Arg His Asp Lys Asp Tyr Asn Glu Val
 195 200 205
 Lys Leu Tyr Glu His Ala Val Ala His Ser Gly Leu Pro Asp Asn Val
 210 215 220
 Lys
 225

 <210> 6
 <211> 678
 <212> DNA
 <213> Trachyphyllia geoffroyi
 <400> 6
 atg agt ctg att aaa cca gaa atg aag atc aag ctg ctt atg gaa ggc 48
 Met Ser Leu Ile Lys Pro Glu Met Lys Ile Lys Leu Leu Met Glu Gly
 1 5 10 15
 aat gta aac ggg cac cag ttt gtt att gag gga gat gga aaa ggc cat 96
 Asn Val Asn Gly His Gln Phe Val Ile Glu Gly Asp Gly Lys Gly His
 20 25 30
 cct ttt gag gga aaa cag agt atg gac ctt gta gtc aaa gaa ggc gca 144
 Pro Phe Glu Gly Lys Gln Ser Met Asp Leu Val Val Lys Glu Gly Ala
 35 40 45
 cct ctc cct ttt gcc tac gat atc ttg aca aca gca ttc cat tat ggt 192
 Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Ala Phe His Tyr Gly
 50 55 60
 aac agg gtt ttt gct aaa tac cca gac cat ata cca gac tac ttc aag 240

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

Asn Arg Val Phe Ala Lys Tyr Pro Asp His Ile Pro Asp Tyr Phe Lys
65 70 75 80
cag tcg ttt ccc aaa ggg ttt tct tgg gag cga agc ctg atg ttc gag 288
Gln Ser Phe Pro Lys Gly Phe Ser Trp Glu Arg Ser Leu Met Phe Glu
85 90 95
gac ggg ggc gtt tgc atc gct aca aat gac ata aca ctg aaa gga gac 336
Asp Gly Gly Val Cys Ile Ala Thr Asn Asp Ile Thr Leu Lys Gly Asp
100 105 110
act ttt ttt aac aaa gtt cga ttt gat ggc gta aac ttt ccc cca aat 384
Thr Phe Phe Asn Lys Val Arg Phe Asp Gly Val Asn Phe Pro Pro Asn
115 120 125
ggt cct gtt atg cag aag aag act ctg aaa tgg gag gca tcc act gag 432
Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Leu Lys Trp Glu Ala Ser Thr Glu
130 135 140
aaa atg tat ttg cgt gat gga gtg ttg acg ggc gat att acc atg gct 480
Lys Met Tyr Leu Arg Asp Gly Val Leu Thr Gly Asp Ile Thr Met Ala
145 150 155 160
ctg ctg ctt aaa gga gat gtc cat tac cga tgt gac ttc aga act act 528
Leu Leu Leu Lys Gly Asp Val His Tyr Arg Cys Asp Phe Arg Thr Thr
165 170 175
tac aaa tct agg cag gag ggt gtc aag ttg cca gga tat cac ttt gtc 576
Tyr Lys Ser Arg Gln Glu Gly Val Lys Leu Pro Gly Tyr His Phe Val
180 185 190
gat cac tgc atc agc ata ttg agg cat gac aaa gac tac aac gag gtt 624
Asp His Cys Ile Ser Ile Leu Arg His Asp Lys Asp Tyr Asn Glu Val
195 200 205

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

aag ctg tat gag cat gct gtt gcc cat tct gga ttg ccg gac aac gtc 672

Lys Leu Tyr Glu His Ala Val Ala His Ser Gly Leu Pro Asp Asn Val

210

215

220

aag taa

678

Lys

225

<210> 7

<211> 225

<212> PRT

<213> Trachyphyllia geoffroyi

<400> 7

Met Ser Leu Ile Lys Pro Glu Met Lys Ile Lys Leu Leu Met Glu Gly

1

5

10

15

Asn Val Asn Gly His Gln Phe Val Ile Glu Gly Asp Gly Lys Gly His

20

25

30

Pro Phe Glu Gly Lys Gln Ser Met Asp Leu Val Val Lys Glu Gly Ala

35

40

45

Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Ala Phe His Tyr Gly

50

55

60

Asn Arg Val Phe Ala Lys Tyr Pro Asp His Ile Pro Asp Tyr Phe Lys

65

70

75

80

Gln Ser Phe Pro Lys Gly Phe Ser Trp Glu Arg Ser Leu Met Phe Glu

85

90

95

Asp Gly Gly Val Cys Ile Ala Thr Asn Asp Ile Thr Leu Lys Gly Asp

100

105

110

11/36

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

Thr Phe Phe Asn Lys Val Arg Phe Asp Gly Val Asn Phe Pro Pro Asn
 115 120 125
 Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Leu Lys Trp Glu Ala Ser Thr Glu
 130 135 140
 Lys Met Tyr Leu Arg Asp Gly Val Leu Thr Gly Asp Ile Arg Met Glu
 145 150 155 160
 Leu Leu Leu Lys Gly Asp Val His Tyr Arg Cys Asp Phe Arg Thr Thr
 165 170 175
 Tyr Lys Ser Arg Gln Glu Gly Val Lys Leu Pro Gly Tyr His Phe Val
 180 185 190
 Asp His Cys Ile Ser Ile Leu Arg His Asp Lys Asp Tyr Asn Glu Val
 195 200 205
 Lys Leu Tyr Glu His Ala Val Ala His Ser Gly Leu Pro Asp Asn Val
 210 215 220
 Lys
 225

<210> 8

<211> 678

<212> DNA

<213> *Trachyphyllia geoffroyi*

<400> 8

atg agt ctg att aaa cca gaa atg aag atc aag ctg ctt atg gaa ggc 48
 Met Ser Leu Ile Lys Pro Glu Met Lys Ile Lys Leu Leu Met Glu Gly
 1 5 10 15
 aat gta aac ggg cac cag ttt gtt att gag gga gat gga aaa ggc cat 96

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

Asn Val Asn Gly His Gln Phe Val Ile Glu Gly Asp Gly Lys Gly His
20 25 30
cct ttt gag gga aaa cag agt atg gac ctt gta gtc aaa gaa ggc gca 144
Pro Phe Glu Gly Lys Gln Ser Met Asp Leu Val Val Lys Glu Gly Ala
35 40 45
cct ctc cct ttt gcc tac gat atc ttg aca aca gca ttc cat tat ggt 192
Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Ala Phe His Tyr Gly
50 55 60
aac agg gtt ttt gct aaa tac cca gac cat ata cca gac tac ttc aag 240
Asn Arg Val Phe Ala Lys Tyr Pro Asp His Ile Pro Asp Tyr Phe Lys
65 70 75 80
cag tcg ttt ccc aaa ggg ttt tct tgg gag cga agc ctg atg ttc gag 288
Gln Ser Phe Pro Lys Gly Phe Ser Trp Glu Arg Ser Leu Met Phe Glu
85 90 95
gac ggg ggc gtt tgc atc gct aca aat gac ata aca ctg aaa gga gac 336
Asp Gly Gly Val Cys Ile Ala Thr Asn Asp Ile Thr Leu Lys Gly Asp
100 105 110
act ttt ttt aac aaa gtt cga ttt gat ggc gta aac ttt ccc cca aat 384
Thr Phe Phe Asn Lys Val Arg Phe Asp Gly Val Asn Phe Pro Pro Asn
115 120 125
ggt cct gtt atg cag aag aag act ctg aaa tgg gag gca tcc act gag 432
Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Leu Lys Trp Glu Ala Ser Thr Glu
130 135 140
aaa atg tat ttg cgt gat gga gtg ttg acg ggc gat att agg atg gag 480
Lys Met Tyr Leu Arg Asp Gly Val Leu Thr Gly Asp Ile Arg Met Glu
145 150 155 160

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

ctg ctg ctt aaa gga gat gtc cat tac cga tgt gac ttc aga act act 528

Leu Leu Leu Lys Gly Asp Val His Tyr Arg Cys Asp Phe Arg Thr Thr

165

170

175

tac aaa tct agg cag gag ggt gtc aag ttg cca gga tat cac ttt gtc 576

Tyr Lys Ser Arg Gln Glu Gly Val Lys Leu Pro Gly Tyr His Phe Val

180

185

190

gat cac tgc atc agc ata ttg agg cat gac aaa gac tac aac gag gtt 624

Asp His Cys Ile Ser Ile Leu Arg His Asp Lys Asp Tyr Asn Glu Val

195

200

205

aag ctg tat gag cat gct gtt gcc cat tct gga ttg ccg gac aac gtc 672

Lys Leu Tyr Glu His Ala Val Ala His Ser Gly Leu Pro Asp Asn Val

210

215

220

aag taa

678

Lys

225

<210> 9

<211> 229

<212> PRT

<213> Scolymia Vitiensis

<400> 9

Met Val Ser Val Ile Lys Asp Glu Met Lys Val Asn Leu Arg Met Glu

1

5

10

15

Gly Ser Val Asn Gly His Asp Phe Val Ile Asp Gly Leu Gly Ser Gly

20

25

30

Lys Pro Lys Glu Gly Thr Gln Thr Ile Glu Leu Lys Val Val Lys Gly

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

35 40 45
Gly Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Ala Phe His Tyr
50 55 60
Gly Asn Arg Val Phe Ala Lys Tyr Pro Lys Asp Ile Pro Asn Tyr Phe
65 70 75 80
Glu Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Ser Trp Glu Arg Ser Met Ile Phe
85 90 95
Glu Asp Gly Gly Ile Cys Ile Ala Arg Asn Asp Ile Thr Met Asp Gly
100 105 110
Gly Thr Phe Tyr Asn Lys Val Arg Phe Tyr Gly Val Asn Phe Pro Pro
115 120 125
Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Lys Trp Glu Gln Ser Thr
130 135 140
Glu Lys Met Tyr Ala Arg Asp Gly Val Leu Thr Gly Asp Ile Asn Met
145 150 155 160
Ala Leu Leu Leu Lys Gly Gly Gly His Tyr Arg Cys Asp Phe Arg Thr
165 170 175
Thr Phe Lys Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Leu Pro Gly Tyr His Phe
180 185 190
Ile Asp His Cys Ile Glu Ile Leu Ser His Arg Asn Asp Tyr Asn Asn
195 200 205
Val Thr Leu Phe Glu His Ala Val Ala Arg Ser Gly Leu Gln Asp Lys
210 215 220
Glu Lys Gln Gln Gln
225

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

<210> 10

<211> 690

<212> DNA

<213> Scolymia Vitiensis

<400> 10

atg gtg agt gtg att aag gac gaa atg aaa gtc aac ctg cgt atg gaa 48

Met Val Ser Val Ile Lys Asp Glu Met Lys Val Asn Leu Arg Met Glu

1 5 10 15

ggc agt gta aac gga cac gac ttc gtg att gac gga ctt ggt tca ggc 96

Gly Ser Val Asn Gly His Asp Phe Val Ile Asp Gly Leu Gly Ser Gly

20 25 30

aag cct aaa gag gga aca cag act att gag ctt aaa gtc gta aag ggt 144

Lys Pro Lys Glu Gly Thr Gln Thr Ile Glu Leu Lys Val Val Lys Gly

35 40 45

gga cct tta cct ttc gcc tac gat atc ctg aca aca gca ttc cat tac 192

Gly Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Ala Phe His Tyr

50 55 60

ggc aac cgg gta ttc gcc aaa tac cca aag gat ata cca aac tat ttc 240

Gly Asn Arg Val Phe Ala Lys Tyr Pro Lys Asp Ile Pro Asn Tyr Phe

65 70 75 80

gag cag tcg ttt cct gag ggg tat tcg tgg gaa cgg agc atg att ttc 288

Glu Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Ser Trp Glu Arg Ser Met Ile Phe

85 90 95

gaa gac ggg ggc att tgc atc gct aga aac gac ata aca atg gat ggt 336

Glu Asp Gly Gly Ile Cys Ile Ala Arg Asn Asp Ile Thr Met Asp Gly

100 105 110

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

ggc act ttc tat aat aaa gtt cga ttt tat ggt gta aat ttc ccc ccc 384

Gly Thr Phe Tyr Asn Lys Val Arg Phe Tyr Gly Val Asn Phe Pro Pro

115

120

125

aat ggt cca gtt atg cag aag aag acg cag aaa tgg gag caa tcc act 432

Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Lys Trp Glu Gln Ser Thr

130

135

140

gag aaa atg tat gcg cgt gat gga gtg ttg acg ggt gat att aac atg 480

Glu Lys Met Tyr Ala Arg Asp Gly Val Leu Thr Gly Asp Ile Asn Met

145

150

155

160

gct ctg ttg ctt aaa ggg ggt ggc cat tac cga tgt gac ttc aga act 528

Ala Leu Leu Leu Lys Gly Gly Gly His Tyr Arg Cys Asp Phe Arg Thr

165

170

175

act ttc aaa gct aag gag aag ggt gtc aag ttg cca ggc tac cac ttt 576

Thr Phe Lys Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Leu Pro Gly Tyr His Phe

180

185

190

ata gat cac tgc ata gag att tta agc cat cgc aac gat tac aac aac 624

Ile Asp His Cys Ile Glu Ile Leu Ser His Arg Asn Asp Tyr Asn Asn

195

200

205

gtt acg ctt ttt gag cat gct gtt gct cgt tct gga ttg cag gac aaa 672

Val Thr Leu Phe Glu His Ala Val Ala Arg Ser Gly Leu Gln Asp Lys

210

215

220

gag aaa caa caa caa tga

690

Glu Lys Gln Gln Gln

225

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

<210> 11

<211> 229

<212> PRT

<213> Scolymia Vitiensis

<400> 11

Met Val Ser Val Ile Lys Asp Glu Met Lys Val Asn Leu Arg Met Glu

1 5 10 15

Gly Ser Val Asn Gly His Asp Phe Val Ile Asp Gly Leu Gly Ser Gly

20 25 30

Lys Pro Lys Glu Gly Thr Gln Thr Ile Glu Leu Lys Val Val Lys Gly

35 40 45

Gly Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Ala Phe His Tyr

50 55 60

Gly Asn Arg Val Phe Ala Lys Tyr Pro Lys Asp Ile Pro Asn Tyr Phe

65 70 75 80

Glu Gln Ser Phe Pro Lys Gly Tyr Ser Trp Glu Arg Ser Met Ile Phe

85 90 95

Glu Asp Gly Gly Ile Cys Ile Ala Arg Asn Asp Ile Thr Met Glu Gly

100 105 110

Gly Thr Phe Tyr Asn Lys Val Arg Phe Tyr Gly Val Asn Phe Pro Pro

115 120 125

Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Lys Trp Glu Pro Ser Thr

130 135 140

Glu Lys Met Tyr Ala Arg Asp Gly Val Leu Thr Gly Asp Ile Asn Met

145 150 155 160

Ala Leu Leu Leu Lys Gly Gly Gly His Tyr Arg Cys Asp Phe Arg Thr

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

165 170 175
Thr Phe Lys Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Leu Pro Gly Tyr His Phe
180 185 190
Ile Asp His Cys Ile Glu Ile Leu Ser His His Asn Asp Tyr Asn Asn
195 200 205
Val Thr Leu Phe Glu His Ala Val Ala Arg Ser Gly Leu Gln Asp Lys
210 215 220
Glu Lys Gln Gln Gln

225

<210> 12

<211> 690

<212> DNA

<213> Scolymia Vitiensis

<400> 12

atg gtg agt gtg att aag gac gaa atg aaa gtc aac ctg cgt atg gaa 48

Met Val Ser Val Ile Lys Asp Glu Met Lys Val Asn Leu Arg Met Glu

1 5 10 15

ggc agt gta aac gga cac gac ttc gtg att gac gga ctt ggt tca ggc 96

Gly Ser Val Asn Gly His Asp Phe Val Ile Asp Gly Leu Gly Ser Gly

20 25 30

aag cct aaa gag gga aca cag act att gag ctt aaa gtc gta aag ggt 144

Lys Pro Lys Glu Gly Thr Gln Thr Ile Glu Leu Lys Val Val Lys Gly

35 40 45

gga cct tta cct ttc gcc tac gat atc ctg aca aca gca ttc cat tac 192

Gly Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Ala Phe His Tyr

19/36

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

50 55 60
ggc aac cgg gta ttc gcc aaa tac cca aag gat ata cca aac tat ttc 240
Gly Asn Arg Val Phe Ala Lys Tyr Pro Lys Asp Ile Pro Asn Tyr Phe
65 70 75 80
gag cag tcg ttt cct aag ggg tat tcg tgg gaa cgg agc atg att ttc 288
Glu Gln Ser Phe Pro Lys Gly Tyr Ser Trp Glu Arg Ser Met Ile Phe
85 90 95
gaa gac ggg ggc att tgc atc gcc aga aac gac ata aca atg gaa ggt 336
Glu Asp Gly Gly Ile Cys Ile Ala Arg Asn Asp Ile Thr Met Glu Gly
100 105 110
ggc act ttc tat aat aaa gtt cga ttt tat ggt gta aac ttc ccc ccc 384
Gly Thr Phe Tyr Asn Lys Val Arg Phe Tyr Gly Val Asn Phe Pro Pro
115 120 125
aat ggt cca gtt atg cag aag aag acg cag aag tgg gag cca tcc act 432
Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Lys Trp Glu Pro Ser Thr
130 135 140
gag aaa atg tat gcg cgt gat gga gtg ttg acg ggt gat att aac atg 480
Glu Lys Met Tyr Ala Arg Asp Gly Val Leu Thr Gly Asp Ile Asn Met
145 150 155 160
gct ctg ttg ctt aaa ggg ggt ggc cat tac cga tgt gac ttc aga act 528
Ala Leu Leu Leu Lys Gly Gly Gly His Tyr Arg Cys Asp Phe Arg Thr
165 170 175
act ttc aaa gct aag gag aag ggt gtc aag ttg cca ggc tac cac ttt 576
Thr Phe Lys Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Leu Pro Gly Tyr His Phe
180 185 190
ata gat cac tgc ata gag att tta agc cat cac aac gat tac aac aac 624

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

Ile Asp His Cys Ile Glu Ile Leu Ser His His Asn Asp Tyr Asn Asn
195 200 205
gtt acg ctt ttt gag cat gct gtt gct cgt tct gga ttg cag gac aaa 672
Val Thr Leu Phe Glu His Ala Val Ala Arg Ser Gly Leu Gln Asp Lys
210 215 220
gag aaa caa caa caa tga 690
Glu Lys Gln Gln Gln
225

<210> 13

<211> 229

<212> PRT

<213> Scolymia Vitiensis

<400> 13

Met Val Ser Val Ile Lys Asp Glu Met Lys Val Asn Leu Arg Met Glu
1 5 10 15
Gly Ser Val Asn Gly His Asp Phe Val Ile Asp Gly Leu Gly Ser Gly
20 25 30
Lys Pro Lys Glu Gly Thr Gln Thr Ile Glu Leu Lys Val Val Lys Gly
35 40 45
Gly Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Ala Phe His Tyr
50 55 60
Gly Asn Arg Val Phe Ala Lys Tyr Pro Lys Asp Ile Pro Asn Tyr Phe
65 70 75 80
Glu Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Ser Trp Glu Arg Ser Met Ile Phe
85 90 95

21/36

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

Glu Asp Gly Gly Ile Cys Ile Ala Arg Asn Asp Ile Thr Met Asp Gly
100 105 110
Gly Thr Phe Tyr Asn Lys Val Arg Phe Tyr Gly Val Asn Phe Pro Pro
115 120 125
Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Lys Trp Glu Gln Ser Thr
130 135 140
Glu Lys Met Tyr Ala Arg Asp Gly Val Leu Thr Gly Asp Ile Asn Met
145 150 155 160
Ala Leu Leu Leu Lys Gly Gly Gly His Tyr Arg Cys Asp Phe Arg Thr
165 170 175
Thr Phe Lys Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Leu Pro Gly Tyr His Phe
180 185 190
Ile Asp His Cys Met Glu Ile Leu Ser His Arg Asn Asp Tyr Asn Asn
195 200 205
Val Thr Leu Phe Glu His Ala Val Ala Arg Ser Gly Leu Gln Asp Lys
210 215 220
Glu Lys Gln Gln Gln
225

<210> 14

<211> 690

<212> DNA

<213> Scolymia Vitiensis

<400> 14

atg gtg agt gtg att aag gac gaa atg aaa gtc aac ctg cgt atg gaa 48

Met Val Ser Val Ile Lys Asp Glu Met Lys Val Asn Leu Arg Met Glu

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

1 5 10 15
ggc agt gta aac gga cac gac ttc gtg att gac gga ctt ggt tca ggc 96
Gly Ser Val Asn Gly His Asp Phe Val Ile Asp Gly Leu Gly Ser Gly
20 25 30
aag cct aaa gag gga aca cag act att gag ctt aaa gtc gta aag ggt 144
Lys Pro Lys Glu Gly Thr Gln Thr Ile Glu Leu Lys Val Val Lys Gly
35 40 45
gga cct tta cct ttc gcc tac gat atc ctg aca aca gca ttc cat tac 192
Gly Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Ala Phe His Tyr
50 55 60
ggc aac cgg gta ttc gcc aaa tac cca aag gat ata cca aac tat ttc 240
Gly Asn Arg Val Phe Ala Lys Tyr Pro Lys Asp Ile Pro Asn Tyr Phe
65 70 75 80
gag cag tcg ttt cct gag ggg tat tcg tgg gaa cgg agc atg att ttc 288
Glu Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Ser Trp Glu Arg Ser Met Ile Phe
85 90 95
gaa gac ggg ggc att tgc atc gct aga aac gac ata aca atg gat ggt 336
Glu Asp Gly Gly Ile Cys Ile Ala Arg Asn Asp Ile Thr Met Asp Gly
100 105 110
ggc act ttc tat aat aaa gtt cga ttt tat ggt gta aat ttc ccc ccc 384
Gly Thr Phe Tyr Asn Lys Val Arg Phe Tyr Gly Val Asn Phe Pro Pro
115 120 125
aat ggt cca gtt atg cag aag aag acg cag aaa tgg gag caa tcc act 432
Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Lys Trp Glu Gln Ser Thr
130 135 140
gag aaa atg tat gcg cgt gat gga gtg ttg acg ggt gat att aac atg 480

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

Glu Lys Met Tyr Ala Arg Asp Gly Val Leu Thr Gly Asp Ile Asn Met
 145 150 155 160
 gct ctg ttg ctt aaa ggg ggt ggc cat tac cga tgt gac ttc aga act 528
 Ala Leu Leu Leu Lys Gly Gly Gly His Tyr Arg Cys Asp Phe Arg Thr
 165 170 175
 act ttc aaa gct aag gag aag ggt gtc aag ttg cca ggc tac cac ttt 576
 Thr Phe Lys Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Leu Pro Gly Tyr His Phe
 180 185 190
 ata gat cac tgc atg gag att tta agc cat cgc aac gat tac aac aac 624
 Ile Asp His Cys Met Glu Ile Leu Ser His Arg Asn Asp Tyr Asn Asn
 195 200 205
 gtt acg-ctt ttt gag cat gct gtt gct cgt tct gga ttg cag gac aaa 672
 Val Thr Leu Phe Glu His Ala Val Ala Arg Ser Gly Leu Gln Asp Lys
 210 215 220
 gag aaa caa caa caa tga 690
 Glu Lys Gln Gln Gln
 225

<210> 15

<211> 223

<212> PRT

<213> Scolymia Vitiensis

<400> 15

Met Val Ser Val Ile Lys Asp Glu Met Lys Val Arg Leu Arg Met Glu

1

5

10

15

Gly Ser Val Asn Gly His Asp Phe Val Ile Asp Gly Thr Gly Ser Gly

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

20 25 30
Lys Pro Lys Glu Gly Thr Gln Thr Ile Glu Leu Lys Val Val Lys Gly
35 40 45
Gly Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Ala Phe His Tyr
50 55 60
Gly Asn Arg Val Phe Ala Lys Tyr Pro Lys Asp Ile Pro Asn Tyr Phe
65 70 75 80
Glu Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Ser Trp Glu Arg Ser Met Ile Phe
85 90 95
Glu Asp Gly Gly Ile Cys Ile Ala Arg Asn Asp Ile Thr Met Asp Gly
100 105 110
Gly Thr Phe Tyr Asn Lys Val Arg Phe Glu Gly Val Asn Phe Pro Pro
115 120 125
Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Asn Thr Leu Lys Trp Glu Pro Ser Thr
130 135 140
Glu Lys Met Tyr Ala Arg Asp Gly Val Leu Thr Gly Asp Ile Asp Met
145 150 155 160
Ser Leu Leu Leu Lys Gly Gly Gly His Tyr Arg Cys Asp Phe Arg Thr
165 170 175
Thr Phe Lys Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Leu Pro Gly Thr His Tyr
180 185 190
Ile Asp His Ser Ile Glu Ile Leu Ser His Arg Asn Asp Tyr Asn Asn
195 200 205
Val Thr Leu Phe Glu His Ala Val Ala Arg Ser Gly Leu Gln Asp
210 215 220

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

<210> 16

<211> 672

<212> DNA

<213> Scolymia Vitiensis

<400> 16

atg gtg agt gtg att aag gac gaa atg aaa gtc cgc ctg cgt atg gaa 48
Met Val Ser Val Ile Lys Asp Glu Met Lys Val Arg Leu Arg Met Glu
1 5 10 15
ggc agt gta aac gga cac gac ttc gtg att gac gga act ggt tca ggc 96
Gly Ser Val Asn Gly His Asp Phe Val Ile Asp Gly Thr Gly Ser Gly
20 25 30
aag cct aaa gag gga aca cag act att gag ctt aaa gtc gta aag ggt 144
Lys Pro Lys Glu Gly Thr Gln Thr Ile Glu Leu Lys Val Val Lys Gly
35 40 45
gga cct tta cct ttc gcc tac gat atc ctg aca aca gca ttc cat tac 192
Gly Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Ala Phe His Tyr
50 55 60
ggc aac cgg gta ttc gcc aaa tac cca aag gat ata cca aac tat ttc 240
Gly Asn Arg Val Phe Ala Lys Tyr Pro Lys Asp Ile Pro Asn Tyr Phe
65 70 75 80
gag cag tcg ttt cct gag ggg tat tcg tgg gaa cgg agc atg att ttc 288
Glu Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Ser Trp Glu Arg Ser Met Ile Phe
85 90 95
gaa gac ggg ggc att tgc atc gct aga aac gac ata aca atg gat ggt 336
Glu Asp Gly Gly Ile Cys Ile Ala Arg Asn Asp Ile Thr Met Asp Gly
100 105 110

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

ggc act ttc tat aat aaa gtt cga ttt gaa ggt gta aat ttc ccc ccc 384

Gly Thr Phe Tyr Asn Lys Val Arg Phe Glu Gly Val Asn Phe Pro Pro

115

120

125

aat ggt cca gtt atg cag aag aat acg ctg aaa tgg gag cca tcc act 432

Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Asn Thr Leu Lys Trp Glu Pro Ser Thr

130

135

140

gag aaa atg tat gcg cgt gat gga gtg ttg acg ggt gat att gac atg 480

Glu Lys Met Tyr Ala Arg Asp Gly Val Leu Thr Gly Asp Ile Asp Met

145

150

155

160

tcc ctg ttg ctt aaa ggg ggt ggc cat tac cga tgt gac ttc aga act 528

Ser Leu Leu Leu Lys Gly Gly Gly His Tyr Arg Cys Asp Phe Arg Thr

165

170

175

act ttc aaa gct aag gag aag ggt gtc aag ttg cca ggc acc cac tac 576

Thr Phe Lys Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Leu Pro Gly Thr His Tyr

180

185

190

ata gat cac agc ata gag att tta agc cat cgc aac gat tac aac aac 624

Ile Asp His Ser Ile Glu Ile Leu Ser His Arg Asn Asp Tyr Asn Asn

195

200

205

gtt acg ctt ttt gag cat gct gtt gct cgt tct gga ttg cag gac taa 672

Val Thr Leu Phe Glu His Ala Val Ala Arg Ser Gly Leu Gln Asp

210

215

220

<210> 17

<211> 223

<212> PRT

<213> Scolymia Vitiensis

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

<400> 17

Met Val Ser Val Ile Lys Asp Glu Met Lys Val Arg Leu Arg Met Glu

1 5 10 15

Gly Ser Val Asn Gly His Asp Phe Val Ile Asp Gly Thr Gly Ser Gly

20 25 30

Lys Pro Lys Glu Gly Thr Gln Thr Ile Glu Leu Lys Val Val Lys Gly

35 40 45

Gly Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Ala Phe His Tyr

50 55 60

Gly Asn Arg Val Phe Ala Lys Tyr Pro Lys Asp Ile Pro Asn Tyr Phe

65 70 75 80

Glu Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Ser Trp Glu Arg Ser Met Thr Phe

85 90 95

Glu Asp Gly Gly Val Cys Thr Ala Arg Asn Asp Ile Thr Met Asp Gly

100 105 110

Gly Thr Phe Tyr Asn Lys Val Arg Phe Glu Gly Thr Asn Phe Pro Pro

115 120 125

Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Leu Lys Trp Glu Pro Ser Thr

130 135 140

Glu Lys Met Tyr Ala Arg Asp Gly Val Leu Thr Gly Asp Ile Asp Met

145 150 155 160

Ser Leu Leu Leu Lys Gly Gly Gly His Tyr Arg Cys Asp Met Arg Thr

165 170 175

Thr Phe Lys Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Leu Pro Gly Thr His Tyr

180 185 190

Ile Asp His Ser Ile Glu Ile Leu Ser His Arg Asn Asp Tyr Asn Asn

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

195 200 205
Val Thr Leu Tyr Glu His Ala Val Ala Arg Ser Gly Leu Gln Asp
210 215 220

<210> 18
<211> 672
<212> DNA
<213> Scolymia Vitiensis
<400> 18

atg gtg agt gtg att aag gac gaa atg aaa gtc cgc ctg cgt atg gaa 48
Met Val Ser Val Ile Lys Asp Glu Met Lys Val Arg Leu Arg Met Glu
1 5 10 15
ggc agt gta aac gga cac gac ttc gtg att gac gga act ggt tca ggc 96
Gly Ser Val Asn Gly His Asp Phe Val Ile Asp Gly Thr Gly Ser Gly
20 25 30
aag cct aaa gag gga aca cag act att gag ctt aaa gtc gta aag ggt 144
Lys Pro Lys Glu Gly Thr Gln Thr Ile Glu Leu Lys Val Val Lys Gly
35 40 45
gga cct tta cct ttc gcc tac gat atc ctg aca aca gca ttc cat tac 192
Gly Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Ala Phe His Tyr
50 55 60
ggc aac cgg gta ttc gcc aaa tac cca aag gat ata cca aac tat ttc 240
Gly Asn Arg Val Phe Ala Lys Tyr Pro Lys Asp Ile Pro Asn Tyr Phe
65 70 75 80
gag cag tcg ttt cct gag ggg tat tcg tgg gaa cgg agc atg act ttc 288
Glu Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Ser Trp Glu Arg Ser Met Thr Phe

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

85 90 95
gaa gac ggg ggc gtt tgc acc gct aga aac gac ata aca atg gat ggt 336
Glu Asp Gly Gly Val Cys Thr Ala Arg Asn Asp Ile Thr Met Asp Gly
100 105 110
ggc act ttc tat aat aaa gtt cga ttt gaa ggt aca aat ttc ccc ccc 384
Gly Thr Phe Tyr Asn Lys Val Arg Phe Glu Gly Thr Asn Phe Pro Pro
115 120 125
aat ggt cca gtt atg cag aag aag acg ctg aaa tgg gag cca tcc act 432
Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Leu Lys Trp Glu Pro Ser Thr
130 135 140
gag aaa atg tat gcg cgt gat gga gtg ttg acg ggt gat att gac atg 480
Glu Lys Met Tyr Ala Arg Asp Gly Val Leu Thr Gly Asp Ile Asp Met
145 150 155 160
tcc ctg ttg ctt aaa ggg ggt ggc cat tac cga tgt gac atg aga act 528
Ser Leu Leu Leu Lys Gly Gly Gly His Tyr Arg Cys Asp Met Arg Thr
165 170 175
act ttc aaa gct aag gag aag ggt gtc aag ttg cca ggc acc cac tac 576
Thr Phe Lys Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Leu Pro Gly Thr His Tyr
180 185 190
ata gat cac agc ata gag att tta agc cat cgc aac gat tac aac aac 624
Ile Asp His Ser Ile Glu Ile Leu Ser His Arg Asn Asp Tyr Asn Asn
195 200 205
gtt acg ctt tat gag cat gct gtt gct cgt tct gga ttg cag gac taa 672
Val Thr Leu Tyr Glu His Ala Val Ala Arg Ser Gly Leu Gln Asp
210 215 220

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 19

gaaggrtgyg tcaayggrca y

21

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 20

acvggdccat ydgvaagaaa rtt

23

<210> 21

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 21

ggccacgcgt cgactagtac gggiigggii gggiig

36

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 22

aagagactcc ttgaagtaat cggga

25

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 23

ggccacgcgt cgactagtac

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 24

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

aaaatatcgt acgcaaaggg

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 25

aggaggtccg ctaccctttg

20

<210> 26

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 26

cccgatccg accatggcta ccttggttaa aga

33

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 27

atcaagntnw ryatggaagg 20

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 28

acvggdccat ydgvaagaaa rtt 23

<210> 29

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 29

ggccacgcgt cgactagtac gggiigggi gggiig 36

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 30

agttcacacc atgatattca atatcata

28

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 31

ggccacgcgt cgactagtac

20

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 32

tcttcgtaag tcatgcttcg ttc

23

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

WO 2004/018671

PCT/JP2003/010628

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 33

ggtattcgcc aaatacccaa a

21

<210> 34

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 34

cccgatccg accatggtga gtgtgattaa ggacgaaatg

40

<210> 35

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 35

ccgctcgagt tggtgtgtt tctctttgtc ctg

33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10628

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K14/35, C12N1/21, C07K19/00, C12Q1/02,
G01N21/78, G01N21/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K14/35, C12N1/21, C07K19/00, C12Q1/02,
G01N21/78, G01N21/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTplus (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/34526 A1 (Clontech Laboratories, Inc.), 15 June, 2000 (15.06.00), Sequence No. 61 & EP 1135532 A1 & JP 2002-531146 A	1-14
A	WO 00/34319 A1 (Clontech Laboratories, Inc.), 15 June, 2000 (15.06.00), Sequence No. 56; Claim 9 (Family: none)	1-14
A	WO 01/27150 A2 (Clontech Laboratories, Inc.), 19 April, 2001 (19.04.01), Claim 13; Fig. 7 & EP 1305412 A2 & AU 200110867 A	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 November, 2003 (19.11.03)

Date of mailing of the international search report
09 December, 2003 (09.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10628

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/059309 A2 (Clontech Laboratories, Inc.), 01 August, 2002 (01.08.02), Claim 5; Fig. 1 (Family: none)	1-14
A	WIEDENMANN J. et al., Cracks in the beta-can: fluorescent proteins from Anemonia sulcata (Anthozoa, Actinaria)., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2000, Vol.97, No.26, pages 14091 to 14096	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10628

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- (1) Inventions as claimed in claims 1 to 14 relating to a chromoprotein originating in *Anthopleure inornata*.
- (2) Inventions as claimed in claims 15 to 17, 21, 22 and 25 to 31 relating to a fluoroprotein originating in *Trachyphyllia geoffroyi*.
- (3) Inventions as claimed in claims 18 to 20 and 23 to 31 relating to a fluoroprotein originating in *Scolymia vitiensis*.

Although the above invention groups (1) to (3) are common to each other in being a chromoprotein or a fluoroprotein, a fluoroprotein originating in an actinia *Anemonia sulcata* had been publicly known. Thus, no technical relevancy involving any technical feature (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1 to 14

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10628

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

clearly indicating a contribution over the prior art is found out among the inventions groups (1) to (3).

Such being the case, the inventions as claimed in claims 1 to 31 are divided into the 3 invention groups as specified above.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP03/10628	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁷ C12N 15/09, C07K 14/35, C12N 1/21, C07K 19/00, C12Q 1/02, G01N 21/78, G01N 21/64			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁷ C12N 15/09, C07K 14/35, C12N 1/21, C07K 19/00, C12Q 1/02, G01N 21/78, G01N 21/64			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
A	WO 00/34526 A1 (Clontech Laboratories, Inc.) 2000. 06. 15 配列番号 6 1 参照 & EP 1135532 A1 & JP 2002-531146 A	1-14	
A	WO 00/34319 A1 (Clontech Laboratories, Inc.) 2000. 06. 15 配列番号 5 6 及び請求項 9 参照 (ファミリーなし)	1-14	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 19. 11. 03		国際調査報告の発送日 09.12.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 富永 みどり 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/10628

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 01/27150 A2(Clontech Laboratories, Inc.)2001.04.19 請求項1 3 及び第7 図参照 & EP 1305412 A2 & AU 200110867 A	1-14
A	WO 02/059309 A2(Clontech Laboratories, Inc.)2002.08.01 請求項5 及び第1 図参照 (ファミリーなし)	1-14
A	WIEDENMANN J. et al, Cracks in the beta-can:fluorescent proteins from Anemonia sulcata(Anthozoa, Actinaria). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, Vol. 97, No. 26, p. 14091-14096	1-14

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/10628

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

- (1) 請求の範囲1-14のペリルインギンチャク由来の色素蛋白質に関連する発明
- (2) 請求の範囲15-17、21、22、25-31のヒュサンゴ由来の蛍光蛋白質に関連する発明
- (3) 請求の範囲18-20、23-31のアザミハナガタサンゴ由来の蛍光蛋白質に関連する発明

上記(1)～(3)の各発明群は、色素蛋白質又は蛍光蛋白質であるという点で共通するが、インギンチャクであるAnemonia sulcata由来の蛍光蛋白質は、公知であるから、(1)～(3)に記載の発明群はそれぞれ、先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴を含む技術的な関係があると認めることができない。したがって、請求の範囲1-31に記載された発明は、上記の3つの発明群に区分される。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-14

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。